



(11)

EP 2 459 232 B1

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
08.03.2017 Bulletin 2017/10

(51) Int Cl.:
A61K 48/00 ^(2006.01) **C12Q 1/68** ^(2006.01)

(21) Numéro de dépôt: **10747922.2**

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR2010/000539

(22) Date de dépôt: **26.07.2010**

(87) Numéro de publication internationale:
WO 2011/015720 (10.02.2011 Gazette 2011/06)

(54) **UTILISATION DE MICROARN POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIÉES À UN DYSFONCTIONNEMENT DES CILS DES CELLULES ÉPITHÉLIALES MULTICILIÉES**

VERWENDUNG VON MICRO-RNA ZUR BEHANDLUNG VON DURCH DYSFUNKTION DER ZILIEN DER MULTIZILIÄREN EPITHELZELLEN CHARAKTERISIERTEN PATHOLOGIEEN

USE OF MIRNA FOR THE TREATMENT OF DISEASES LINKED TO CILIA DYSFUNCTIONING IN MULTICILIATED EPITHELIAL CELLS.

(84) Etats contractants désignés:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR

WO-A2-2009/143379

(30) Priorité: **29.07.2009 FR 0903723**

(43) Date de publication de la demande:
06.06.2012 Bulletin 2012/23

(73) Titulaire: **Centre National de la Recherche Scientifique**
75016 Paris (FR)

(72) Inventeurs:
• **MARCET, Brice**
F-06110 Le Cannet (FR)
• **BARBRY, Pascal**
F-06000 Nice (FR)
• **WALDMANN, Rainer**
F-83600 Les Adrets De L'Esterel (FR)
• **MARI, Bernard**
F-06300 Nice (FR)
• **CORAUX, Christelle**
F-51100 Reims (FR)

(74) Mandataire: **Gevers & Orès**
41 avenue de Friedland
75008 Paris (FR)

(56) Documents cités:
WO-A1-2008/116267 WO-A1-2009/137912
WO-A2-2008/073922 WO-A2-2008/137862

- **QIAN S ET AL: "MicroRNA expression profile of bronchioalveolar stem cells from mouse lung" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 377, no. 2, 12 décembre 2008 (2008-12-12), pages 668-673, XP025646136 ISSN: 0006-291X [extrait le 2008-10-21]**
- **PERRY MARK M ET AL: "Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 180, no. 8, avril 2008 (2008-04), pages 5689-5698, XP7911920 ISSN: 0022-1767**
- **NANA-SINKAM SERGE P ET AL: "Integrating the MicroRNome into the study of lung disease." AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE 1 JAN 2009, vol. 179, no. 1, 1 janvier 2009 (2009-01-01), pages 4-10, XP7911921 ISSN: 1535-4970**
- **LU YUN ET AL: "Epithelial progenitor cells of the embryonic lung and the role of microRNAs in their proliferation." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY 15 APR 2008, vol. 5, no. 3, 15 avril 2008 (2008-04-15), pages 300-304, XP7911922 ISSN: 1546-3222**

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

EP 2 459 232 B1

- DATABASE MEDLINE [en ligne] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US 05 Juin 2014 SONG RUI ET AL: 'miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110.' Database accession no. NLM24899310 & SONG RUI ET AL: 'miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110.' NATURE vol. 510, no. 7503, 05 Juin 2014, pages 115 - 120 ISSN: 1476-4687
- DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US Juillet 2014 WU JINGWEN ET AL: 'Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis' Database accession no. PREV201400603968 & PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 111, no. 28, July 2014 (2014-07), pages E2851-E2857, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.1407777111

Description

[0001] La présente invention se rapporte au domaine de la régénération et de la différenciation des épithélia ciliés de vertébrés, notamment de mammifères, et en particulier d'hommes, conduisant à une ciliogénèse fonctionnelle et à l'implication de microARN dans le processus de régénération et de différenciation desdits épithélia ainsi qu'aux gènes modulés par lesdits microARN.

[0002] La présente invention se rapporte plus particulièrement à l'utilisation de microARN dans le traitement des maladies liées à un dysfonctionnement des cils des cellules épithéliales multiciliées, en particulier, les désordres résultant d'une ciliogénèse non fonctionnelle, telles que les maladies respiratoires chroniques pour lesquelles la régénération et/ou la différenciation de l'épithélium respiratoire est défectueuse.

[0003] Les cellules ciliées qui tapissent la surface apicale des épithélia sont essentielles pour divers processus physiologiques tels que le nettoyage des voies respiratoires, l'implantation de l'embryon ou encore la circulation du fluide céphalorachidien. Une ciliogénèse défectueuse provoque directement ou est associée à une grande variété de pathologies.

[0004] Le processus de ciliogénèse comporte une séquence d'événements qui débute par l'acquisition de l'identité de la cellule ciliée (phase 1). Cette première étape consiste en une inhibition latérale entre deux cellules adjacentes par le système de signalisation Notch via une interaction entre Notch et son ligand tel que delta-like 1 (DLL1). La cellule exprimant le ligand DLL1 devient une cellule progénitrice de cellules ciliées, simultanément, l'activation de Notch dans les cellules voisines empêche la transformation de ces cellules en cellules progénitrices de cellules ciliées. Les inventeurs ont montré que la cellule progénitrice de cellules ciliées exprime les microARN de la famille miR-449 et le facteur de transcription FOXJ1. Au cours d'une seconde phase, les miR-449 inhibent la division cellulaire et induisent la différenciation. La multiplication des centrioles débute dans la cellule progénitrice des cellules ciliées, cette multiplication est suivie l'ancrage des corps basaux au pôle apical des cellules ; cette étape est suivie par l'assemblage de l'axonème et la synthèse des cils proprement dite.

[0005] Les épithéliaux assurent une fonction de barrière entre le milieu interne et l'environnement extérieur. Les voies respiratoires sont tapissées par un épithélium pseudo-stratifié hautement différencié constitué de cellules basales, sécrétrices de mucus et ciliées (chaque cellule ciliée disposant de centaines de cils). Le battement coordonné de ces nombreux cils présents à la surface de cet épithélium permet l'élimination des déchets portés par le mucus au cours d'un processus appelé clairance mucociliaire. A ce titre, les cils jouent un rôle important dans les processus de défenses contre les infections de première ligne des voies aériennes (Puchelle et al. Proc Am Thorac Soc (2006) 3, 726-733).

[0006] L'exposition permanente de l'épithélium respiratoire à des stress environnementaux causés par des micro-organismes pathogènes, des allergènes, des molécules toxiques, etc... conduit à des lésions tissulaires. A la suite de telles lésions, un processus physiologique de régénération de l'épithélium respiratoire se met en place. Ce processus, lorsqu'il aboutit, répare la lésion et restaure l'intégrité du tissu respiratoire, un tissu différencié et à nouveau fonctionnel se substituant à la lésion.

[0007] Cette régénération met en jeu plusieurs étapes :

- 1) les cellules épithéliales prolifèrent et/ou migrent afin de combler le lit de la blessure ;
- 2) ces premières étapes sont suivies par la mise en place d'une étape de polarisation cellulaire caractérisée par la formation de jonctions serrées et par un adressage différentiel et spécifique de protéines membranaires (canaux, transporteurs d'ions...) entre le pôle apical et le pôle basolatéral (Puchelle et al. 2006 ; Hajj, R. et al. J Pathol (2007) 211, 340-350) ;
- 3) un stade de différenciation terminale conduisant à la formation de cils à la surface des cellules ciliées (ciliogénèse) et à la présence de cellules sécrétrices responsables de la synthèse et de la sécrétion de mucus.

[0008] Un épithélium pseudostratifié mucociliaire se substitue ainsi à la lésion, reconstituant un tissu cilié fonctionnel disposant de propriétés identiques à celles du tissu initial.

[0009] L'ensemble de ces phénomènes biologiques est associé à des mécanismes de transduction de signaux et à des profils d'expression géniques particuliers. Parmi certains acteurs connus et impliqués dans la différenciation et la ciliogénèse de l'épithélium respiratoire, le facteur de transcription *Foxj1* est l'un des mieux documentés (Yu, X. et al. (2008) Nat Genet 40, 1445-1453). *Foxj1* agit à une phase tardive de la ciliogénèse, jouant un rôle dans l'ancrage des corps basaux (petits organites d'organisation structurale voisine des centrioles indispensables à la formation de la base des cils) à la membrane apicale durant la formation de l'axonème (Gomperts, B.N. et al. (2004) J Cell Sci 117, 1329-1337 (2004).

[0010] Dans certaines maladies respiratoires chroniques telles que les broncho-pneumopathies obstructives chroniques (BPCO), la mucoviscidose, l'asthme ou encore la dyskinésie ciliaire primaire (DCP), des inflammations et infections chroniques aboutissent à une destruction du tissu respiratoire (Marshall, W.F. (2008) J Cell Biol 180, 17-21). Pour des raisons encore mal élucidées, ces maladies sont associées à des défauts de régénération et de différenciation

épithéliale. Ces défauts aboutissent à une restructuration anormale du tissu, à une fibrose et à une perte fonctionnelle irréversible (Marshall, W.F., 2008). De nos jours, aucun traitement curatif pour ces différentes maladies n'a été trouvé, et seuls des traitements symptomatiques permettent de lutter avec plus ou moins d'efficacité contre la destruction évolutive du tissu respiratoire. Dans cette perspective, l'élucidation des mécanismes conduisant à la formation de cils fonctionnels (ciliogénèse) représente un enjeu majeur avec des retombées thérapeutiques évidentes.

[0011] La différenciation cellulaire implique des régulations temporelles et spaciales fines de la transcription et de la traduction gouvernant l'expression de gènes spécifiques. Ces événements sont contrôlés par divers signaux moléculaires et mécaniques. La compréhension des mécanismes physiologiques sous-jacents qui président la mise en place de la différenciation et de la ciliogénèse est donc un prélude indispensable à l'élaboration d'approches thérapeutiques plus spécifiques et plus efficaces.

[0012] Les microARN (miARN), petits ARN non-codants d'environ 22 bases découverts en 1993 et dotés de propriétés régulatrices, jouent un rôle clé dans la régulation des phénomènes cellulaires tels que la survie, l'apoptose, la prolifération, l'homéostasie ou la différenciation (Lu, Y. et al. (2007) *Dev Biol* 310, 442-453).

[0013] Leurs mécanismes d'action impliquent la formation d'un complexe entre plusieurs bases du miARN et la partie 3'-non codante de l'ARNm cible. Cette interaction induirait une déstabilisation de l'ARNm cible et/ou une inhibition de la synthèse protéique. La reconnaissance entre un miARN et sa cible est principalement contrôlée par une séquence d'environ 7 bases, située dans la partie 5' du miARN (ci-après séquence de reconnaissance ou seed). De ce fait, chaque miARN aurait la capacité de réguler la stabilité d'un large spectre d'ARNm distincts.

[0014] Plus de 750 miARN ont été caractérisés à ce jour chez l'homme où ils réguleraient plus de 30% des transcrits. La régulation par les miARN apparaît donc comme une régulation majeure de l'expression génique dont l'impact a été jusqu'à présent sous-estimé (Berezikov, E. et al. (2005) *Cell* 120, 21-24; Xie, X. et al. (2005) *Nature* 434, 338-345).

[0015] Les miARN sont transcrits dans le noyau sous forme de longs précurseurs. Ils subissent une première maturation dans le noyau pour donner un précurseur de miARN (pré-miARN) possédant une structure en épingle à cheveux de plus petite taille. Ce précurseur est exporté du noyau vers le cytoplasme où il va subir une dernière maturation. Une dégradation de sa boucle par l'enzyme Dicer génère deux miARN simple brin (un brin 5p et un brin 3p) ; le brin dit mature est pris en charge par un complexe multi-protéique (le complexe RISC, RNA induced silencing complex) qui interagit avec la partie 3'-non-codante des ARNm cibles, tandis que le brin complémentaire dit « star » va subir une dégradation ; le brin complémentaire d'un miARN miR-xy, miR-xy-z ou let-7x est annoté, respectivement, miR-xy*, miR-xy-z* ou let-7x*.

[0016] Des études ont récemment montré l'importance jouée par les microARN chez la souris dans les mécanismes de différenciation et de morphogénèse ; en particulier dans le développement embryonnaire et la prolifération des précurseurs des cellules épithéliales de l'épiderme (Lena, A.M. et al. (2008) *Cell Death Differ* 15, 1187-1195; Yi, R. et al. (2008) *Nature* 452, 225-229) ou bien encore le développement pulmonaire (Lu, Y. et al. (2007) *Dev Biol* 310, 442-453 (2007); Harris, K.S. et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2208-2213; Lu, Y. et al. (2008) *Proc Am Thorac Soc* 5, 300-304). Plus précisément, Lena *et al.* ont démontré l'implication des miARN du locus miR-17-92 dans la morphogénèse pulmonaire chez la souris. Bien qu'il y ait des preuves de l'implication des miARN au cours de la morphogénèse pulmonaire chez la souris, leur(s) rôle(s) précis et leur(s) mécanismes d'action demeurent encore inexplorés.

[0017] Enfin, plusieurs études suggèrent un rôle particulier de certains miARN dans des pathologies telles que les cancers, l'hypertrophie cardiaque, le diabète ou certaines infections virales (Triboulet, R. et al. (2007) *Science* 315, 1579-1582 ; Calin, G.A. & Croce, C.M. (2006) *Nat Rev Cancer* 6, 857-866 ; Grassmann, R. & Jeang, K.T. (2008) *Biochim Biophys Acta* 1779, 706-711 ; Latronico, M.V., (2008) *Physiol Genomics* 34, 239-242; Poy, M.N. et al. (2004) *Nature* 432, 226-230).

[0018] Aucune étude n'a, à ce jour, montré le rôle ou l'implication des miARN dans la régénération et la différenciation des épithélia ciliés, tel que l'épithélium respiratoire, et le contrôle de la ciliogénèse des vertébrés.

[0019] C'est donc pour la première fois que les Inventeurs ont mis en évidence l'implication de certains miARN dans le contrôle de la ciliogénèse de tissus épithéliaux de vertébrés et, en particulier, dans la régénération et la différenciation de cellules épithéliales respiratoires humaines en un épithélium de surface mucociliaire.

[0020] Les Inventeurs ont plus particulièrement utilisés différentes approches expérimentales conjuguant le séquençage à haut-débit des miARN, les biopuces miARN ainsi que la RT-PCR quantitative et identifié les miARN intervenant spécifiquement à différents stades de la différenciation de l'épithélium respiratoire humain et des cellules épidermiques ciliées des embryons de grenouille *Xenopus laevis*, à savoir des signatures des miARN spécifiques 1) de l'étape de prolifération, 2) de la polarisation cellulaire et 3) de la différenciation terminale et de la ciliogénèse.

[0021] Ils ont également confirmé le rôle des miARN ainsi identifiés dans le contrôle de la ciliogénèse de tissus épithéliaux notamment via la répression du ligand DLL1 de Notch.

[0022] Ils ont ainsi montré que le rôle des microARN mis en évidence sur la régénération et la ciliogénèse d'un tissu épithélial respiratoire humain était extrapolable au mécanisme de ciliogénèse de tout tissu épithélial multicilié chez les vertébrés.

[0023] Il a ainsi été mis en évidence que 63 miARN sont exprimés ou réprimés et/ou présents en quantité significative dans le tissu épithélial respiratoire sain au cours de la régénération et de la différenciation (voir les Tableaux III, IV, V

et VI). La constatation d'une variation de l'expression d'un ou plusieurs miARN chez un individu malade par rapport à un individu sain est un indicateur d'un défaut de régulation de l'expression d'un ou plusieurs gènes ; cette variation pourra donc être compensée en administrant le ou les miARN sous-exprimés et/ou en administrant les antagomirs du ou des miARN sur-exprimés.

[0024] Ces résultats trouvent ainsi des applications pour l'évaluation de la capacité de régénération et de la différenciation, et ainsi de conduire une ciliogénèse fonctionnelle, du tissu épithélial cilié d'un sujet ; ils permettent également l'évaluation de la capacité de régénération et/ou de différenciation d'un tissu épithélial respiratoire dudit sujet et trouvent également un intérêt particulier dans le domaine du diagnostic *in vitro* et *in vivo*. En particulier, ils permettent la mise au point d'une méthode d'évaluation de la capacité d'un tissu épithélial cilié de conduire une ciliogénèse fonctionnelle chez un sujet vertébré, notamment mammifère et, de préférence, humain, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes :

- (i) de mesure quantitative du niveau d'expression des miARN du tissu épithélial cilié dudit sujet ;
- (ii) d'établissement du profil d'expression des miARN du tissu épithélial cilié dudit sujet ;
- (iii) de comparaison du profil d'expression des miARN dudit sujet avec le profil d'expression de miARN du tissu épithélial cilié sain d'un ou plusieurs autres sujets, ledit profil comprenant tout ou partie des miARN du Tableau I ci-après ;
- (iv) d'identification d'au moins un miARN dont le niveau d'expression par ledit sujet diffère d'au moins un facteur 2 par rapport au niveau d'expression du même miARN par le ou lesdits autres sujets, c'est-à-dire dont l'un quelconque des niveaux d'expression représente au moins deux fois l'autre niveau d'expression ; et
- (v) de mise en évidence d'un défaut de la capacité de conduire à une ciliogénèse fonctionnelle d'un tissu épithélial cilié relié à une anomalie d'expression d'au moins un miARN dudit sujet si au moins un miARN dudit profil établi à l'étape (ii)

présente un niveau d'expression qui diffère d'au moins un facteur 2 par rapport au niveau d'expression du même miARN dans le profil d'expression du Tableau I. Lorsque le niveau d'expression est exprimé en log2 (comme dans le Tableau I), cela signifie qu'un défaut de la capacité de régénération et/ou de différenciation, et donc de ciliogénèse, d'un tissu épithélial cilié relié à une anomalie d'expression d'au moins un miARN est observé lorsque le niveau d'expression en log2 du sujet à tester varie d'au moins une unité par rapport au profil d'expression chez un ou plusieurs autres sujets sains.

[0025] La mise en oeuvre de cette méthode nécessite l'établissement du profil d'expression des miARN du tissu épithélial cilié d'un sujet pour lequel on souhaite établir un diagnostic relatif à la capacité de régénération et/ou de différenciation d'un tissu épithélial cilié et du profil d'expression des miARN du tissu épithélial cilié d'un ou plusieurs sujets sains, c'est-à-dire choisis pour ne pas présenter de désordre de la différenciation et/ou de la régénération et de la ciliogénèse du tissu épithélial cilié.

[0026] Selon une variante, cette méthode permet l'évaluation de la capacité de régénération et/ou de différenciation et de conduire une ciliogénèse fonctionnelle d'un tissu épithélial respiratoire d'un sujet mammifère, de préférence humain, et comprend les étapes :

- (i) de mesure quantitative du niveau d'expression des miARN du tissu épithélial respiratoire dudit sujet ;
- (ii) d'établissement du profil d'expression des miARN du tissu épithélial respiratoire dudit sujet ;
- (iii) de comparaison du profil d'expression des miARN dudit sujet avec le profil d'expression de miARN dudit tissu épithélial respiratoire sain d'un ou plusieurs autres sujets, ledit profil comprenant tout ou partie des miARN du Tableau I ci-après ;
- (iv) d'identification d'au moins un miARN dont le niveau d'expression par ledit sujet diffère d'au moins un facteur 2 par rapport au niveau d'expression du même miARN par le ou lesdits autres sujets, c'est-à-dire dont l'un quelconque des niveaux d'expression représente au moins deux fois l'autre niveau d'expression ; et
- (v) de mise en évidence d'un défaut de la capacité de régénération et/ou de différenciation d'un tissu épithélial respiratoire relié à une anomalie d'expression d'au moins un miARN dudit sujet si au moins un miARN dudit profil établi à l'étape (ii) présente un niveau d'expression qui diffère d'au moins un facteur 2 par rapport au niveau d'expression du même miARN dans le profil d'expression du Tableau I.

Définitions

[0027]

- Par sujet, on entend un individu vertébré, en particulier mammifère et, de préférence, l'homme. De préférence, le sujet pour lequel on souhaite établir un diagnostic relatif à la capacité d'un tissu épithélial cilié à conduire une ciliogénèse fonctionnelle, il pourra plus spécifiquement s'agir de diagnostiquer la capacité de régénération et/ou

de différenciation d'un tissu épithélial respiratoire et le ou les sujets sains appartiennent à la même espèce.

- dans le cadre de la présente invention, on utilise indifféremment les termes « cilié » et « multicilié » étant entendu que les tissus épithéliaux considérés sont tels que leurs cellules portent plusieurs cils.
- Par profil d'expression des miARN dans un tissu donné, on entend l'ensemble des miARN ayant un niveau d'expression supérieur ou égal à une valeur choisie.
- Le niveau d'expression d'un miARN dans une cellule ou un tissu est déterminé par mesure des miARN présents dans la cellule ou le tissu.
- La mesure du niveau d'expression d'un miARN peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier ; on peut notamment citer, après une étape d'extraction des ARN, le séquençage à haut débit des miARN, le séquençage par NASBA (nucleic acid strand based amplification), par extension d'amorce, ou encore, les puces à ADN permettant l'hybridation des miARN.
- Le niveau d'expression des miARN peut être exprimé par différents moyens tels que :

* le niveau d'intensité d'expression en log2, cette valeur est représentative de la quantité de miARN présent dans une cellule ou un tissu ; pour l'établissement d'un profil d'expression, on retiendra de préférence les miARN qui présentent un niveau d'intensité d'expression en log2 supérieur ou égal à 3 ;
Ce niveau d'intensité d'expression peut être calculé par différents moyens en fonction de technique utilisée pour mesurer les miARN exprimés.

Dans le cas d'une mesure de fluorescence sur des puces du type Agilent (voir les exemples ci-après), la mesure du niveau d'expression correspond à une intensité de fluorescence dont est ensuite calculé le log2. Dans le cas d'un séquençage à haut débit, le niveau d'intensité d'expression comptabilise le nombre de fois où la séquence d'un miARN est séquencée, ce nombre est normalisé par rapport au nombre total de séquences puis son log2 est calculé.

* l'abondance qui représente le pourcentage d'expression d'un miARN dans une cellule ou un tissu par rapport à la quantité totale de miARN exprimés dans la même cellule ou le même tissu, dans ce cas, seront retenus les miARN dont l'abondance est supérieure ou égale à 0,1%, de préférence à 0,5%, de façon encore préférée à 1 %.

[0028] De préférence, les valeurs caractérisant le niveau d'expression sont exprimées en log2.

Le Tableau I ci-dessous décrit le profil d'expression dans lequel le niveau d'expression est exprimé en niveau d'intensité d'expression en log2 des miARN d'un tissu épithélial respiratoire humain sain :

Nom du miARN	Numéro de séquence du miARN (SEQ ID)	Niveau d'intensité d'expression en log2 Au stade différencié (WD) mesuré en HTS
hsa-miR-100	1	9,00
hsa-miR-106b	2	5,39
hsa-miR-125a-5p	3	14,08
hsa-miR-130a	4	11,98
hsa-miR-140-3p	5	13,12
hsa-miR-141	6	9,75
hsa-miR-148a	7	8,97
hsa-miR-151-5p	8	10,22
hsa-miR-15a	9	7,68
hsa-miR-16	10	5,35
hsa-miR-17	11	11,61
hsa-miR-181a	12	0,01
hsa-miR-191	13	16,82
hsa-miR-193b	14	11,67
Hsa-miR-1975	15	11,22

EP 2 459 232 B1

(suite)

	Nom du miARN	Numéro de séquence du miARN (SEQ ID)	Niveau d'intensité d'expression en log2 Au stade différencié (WD) mesuré en HTS
5	hsa-miR-200a	16	10,96
	hsa-miR-200b	17	10,64
10	hsa-miR-200c	18	14,57
	hsa-miR-203	19	14,55
	hsa-miR-205	20	15,24
	hsa-miR-21	21	8,09
15	Hsa-miR-21*	73	10,49
	hsa-miR-210	22	9,29
	hsa-miR-22	23	11,22
20	hsa-miR-224	24	14,10
	hsa-miR-23a	25	15,35
	hsa-miR-23b	26	9,35
	hsa-miR-25	27	3,52
25	hsa-miR-26a	28	7,75
	hsa-miR-26b	29	6,81
	hsa-miR-27b	30	14,81
30	hsa-miR-29a	31	14,53
	hsa-miR-29c	32	9,74
	hsa-miR-30b	33	0,01
	hsa-miR-30c	34	10,87
35	hsa-miR-30d	35	8,76
	hsa-miR-30e	36	12,74
	hsa-miR-31	37	11,83
40	hsa-miR-31*	89	11,18
	hsa-miR-34a	38	13,75
	hsa-miR-34b	39	10,65
	Hsa-miR-34b*	91	14,29
45	hsa-miR-34c-5p	40	0,01
	hsa-miR-365	41	2,78
	hsa-miR-374a	42	11,87
50	hsa-miR-378	43	11,70
	hsa-miR-425	44	9,53
	hsa-miR-429	45	15,11
	hsa-miR-449a	46	12,24
55	hsa-miR-449b	47	14,56
	hsa-miR-449c	201	10,98

(suite)

5	Nom du miARN	Numéro de séquence du miARN (SEQ ID)	Niveau d'intensité d'expression en log2 Au stade différencié (WD) mesuré en HTS
	hsa-miR-574-3p	48	13,42
	hsa-miR-92b	49	0,01
10	hsa-miR-939	50	5,43
	hsa-miR-96	51	12,65
	hsa-miR-99a	52	9,00
	hsa-let-7a	157	4,31
15	hsa-let-7b	158	11,28
	hsa-let-7c	159	7,86
	hsa-let-7e	160	7,60
20	hsa-let-7f	161	5,35
	hsa-let-7g	162	12,40

[0029] La méthode peut présenter une étape additionnelle consistant à comparer le profil d'expression de microARN du tissu épithélial cilié, notamment respiratoire, du sujet pour lequel on souhaite établir un diagnostic relatif à la capacité de conduire une ciliogénèse fonctionnelle dudit tissu, notamment de la capacité de régénération et/ou de différenciation, avec un profil d'expression de miARN du tissu épithélial cilié sain d'un ou plusieurs sujets établi à un stade de différenciation particulier, un tel profil peut être établi avec le Tableau IV.

[0030] La mise en oeuvre cette méthode a permis d'identifier les miARN suivants hsa-miR-100, hsa-miR-106b, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-130a, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-181a, hsa-miR-191, hsa-miR-193b, hsa-miR-1975, hsa-miR-200a, hsa-miR-200b, hsa-miR-200c, hsa-miR-203, hsa-miR-205, hsa-miR-21, hsa-miR-210, hsa-miR-22, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23b, hsa-miR-25, hsa-miR-26a, hsa-miR-26b, hsa-miR-27b, hsa-miR-29a, hsa-miR-29c, hsa-miR-30b, hsa-miR-30c, hsa-miR-30d, hsa-miR-30e, hsa-miR-31, hsa-miR-34a, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-365, hsa-miR-374a, hsa-miR-378, hsa-miR-425, hsa-miR-429, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-449c, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-92b, hsa-miR-939, hsa-miR-96, hsa-miR-99a, hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7e, hsa-let-7f et hsa-let-7g de séquence SEQ ID N°1 à 6, 8 à 52, 157 à 162 et 201 (voir le tableau I ci-dessous), leur brin complémentaire « star » de séquence SEQ ID N°53 à 58, 60 à 104, 163 à 168 et 202, ou le brin de séquence complémentaire éventuellement modifié chimiquement, et leur précurseur de séquence SEQ ID N°105 à 110, 112 à 156, 169 à 174, 193 à 200 et 203 pour leur utilisation pour la prévention et/ou le traitement de désordres liés à un dysfonctionnement des cils de tissu épithélial cilié.

[0031] La présente invention se rapporte à un miARN sélectionné dans le groupe constitué par hsa-miR-92b (SEQ ID N°49), hsa-miR-1975 (SEQ ID N°15), hsa-miR-99a (SEQ ID N°52), hsa-miR-191 (SEQ ID N°13), hsa-miR-378 (SEQ ID N°43), hsa-miR-125a-5p (SEQ ID N°3), hsa-miR-203 (SEQ ID N°19), et leur précurseurs de séquence SEQ ID N°107, 117, 119, 123, 147, 153 et 156 et/ou au moins un brin complémentaire des miARN éventuellement modifié chimiquement choisis parmi hsa-miR-205, hsa-miR-17, hsa-miR-29a, hsa-miR-193b, hsa-miR-210 hsa-miR-130a : hsa-miR-205* (SEQ ID N°72), hsa-miR-31 et hsa-miR-31* (SEQ ID N°37 et 89), hsa-miR-17* (SEQ ID N°63), hsa-miR-29a* (SEQ ID N°83), hsa-miR-193b* (SEQ ID N°66), hsa-miR-210* (SEQ ID N°74), hsa-miR-130a* (SEQ ID N°56) et leur précurseurs de séquence SEQ ID N°108, 115, 118, 124 à 126, 135 et 141 pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement de désordres liés à un dysfonctionnement des cils de tissu épithélial cilié.

[0032] On entend par tissu épithélial cilié un tissu dont les cellules portent sur leur surface apicale des cils ; chez les mammifères, il s'agit notamment de l'épithélium respiratoire ou encore de l'épithélium des trompes utérines et l'endomètre de l'utérus, du plexus choroïdien et cellules épendymaires dans le cerveau, et des spermatozoïdes, rete testis et les canaux déférents chez le mâle.

[0033] Par brin de séquence complémentaire d'un premier fragment d'acide nucléique simple brin donné, on entend le fragment d'acide nucléique simple brin dont la séquence est le complément de la séquence dudit premier fragment et capable de s'apparier avec ledit premier fragment.

[0034] Dans le cadre de l'invention, il peut être utilisé des brins de séquence complémentaires modifiés chimiquement, c'est-à-dire que leur séquence comprend une ou plusieurs bases modifiées chimiquement, afin d'améliorer leur stabilité

intracellulaire et extracellulaire et les rendre moins sensibles à l'hydrolyse dans des conditions acides ou basiques ainsi que sous l'action de nucléases ; les modifications envisageables sont notamment celles listées pour les ARN interférents (siRNA) dans la revue de T. M. Rana (Nature Reviews, 2007, vol 8: 23-36) ou telles que décrites dans la Demande WO 20071021896 ; en particulier, les brins de séquence complémentaires peuvent comprendre un nucléotide modifié chimiquement choisi parmi les nucléotides modifié en 2' tels qu'une base 2'-désoxy, 2'-désoxy-2'-fluoro, 2'-O-méthyl, 2'-O-méthoxyéthyl (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropyl (2'-OAP), 2'-O-diméthylaminoéthyl (2'-O-DMAOE), 2'-O-diméthylaminopropyl (2'-O-DMAP), 2'-O-diméthylaminoéthoxyéthyl (2'-O-DMAEOE) ou 2'-O-N-méthylacétamido (2'-O-NMA).

Tableau II - miARN et référence de leur séquence nucléotidique, de la séquence nucléotidique de leur brin complémentaire et de celle de leur précurseur

Nom et Séquence (numéro de SEQ ID) des miARN		Nom et séquence (numéro de SEQ ID) du brin complémentaire		Séquence du précurseur (numéro de SEQ ID)
hsa-miR-100	1	hsa-miR-100*	53	105
hsa-miR-106b	2	hsa-miR-106b*	54	106
hsa-miR-125a-5p	3	hsa-miR-125a-3p	55	107
hsa-miR-130a	4	hsa-miR-130a*	56	108
hsa-miR-140-3p	5	hsa-miR-140-5p	57	109
hsa-miR-141	6	hsa-miR-141*	58	110
hsa-miR-148a	7	hsa-miR-148a*	59	111
hsa-miR-151-5p	8	hsa-miR-151-3p	60	112
hsa-miR-15a	9	hsa-miR-15a*	61	113
hsa-miR-16	10	hsa-miR-16*	62	114, 193
hsa-miR-17	11	hsa-miR-17*	63	115
hsa-miR-181a	12	hsa-miR-181a*	64	116, 194
hsa-miR-191	13	hsa-miR-191*	65	117
hsa-miR-193b	14	hsa-miR-193b*	66	118
Hsa-miR-1975	15	Hsa-miR-1975*	67	119
hsa-miR-200a	16	hsa-miR-200a*	68	120
hsa-miR-200b	17	hsa-miR-200b*	69	121
hsa-miR-200c	18	hsa-miR-200c*	70	122
hsa-miR-203	19	hsa-miR-203*	71	123
hsa-miR-205	20	hsa-miR-205*	72	124
hsa-miR-21	21	hsa-miR-21*	73	125
hsa-miR-210	22	hsa-miR-210*	74	126
hsa-miR-22	23	hsa-miR-22*	75	127
hsa-miR-224	24	hsa-miR-224*	76	128
hsa-miR-23a	25	hsa-miR-23a*	77	129
hsa-miR-23b	26	hsa-miR-23b*	78	130
hsa-miR-25	27	hsa-miR-25*	79	131
hsa-miR-26a	28	hsa-miR-26a*	80	132, 195
hsa-miR-26b	29	hsa-miR-26b*	81	133
hsa-miR-27b	30	hsa-miR-27b*	82	134
hsa-miR-29a	31	hsa-miR-29a*	83	135

(suite)

	Nom et Séquence (numéro de SEQ ID) des miARN		Nom et séquence (numéro de SEQ ID) du brin complémentaire		Séquence du précurseur (numéro de SEQ ID)
5	hsa-miR-29c	32	hsa-miR-29c*	84	136
	hsa-miR-30b	33	hsa-miR-30b*	85	137
	hsa-miR-30c	34	hsa-miR-30c*	86	138, 196
10	hsa-miR-30d	35	hsa-miR-30d*	87	139
	hsa-miR-30e	36	hsa-miR-30e*	88	140
	hsa-miR-31	37	hsa-miR-31*	89	141
	hsa-miR-34a	38	hsa-miR-34a*	90	142
15	hsa-miR-34b	39	hsa-miR-34b*	91	143
	hsa-miR-34c-5p	40	hsa-miR-34c-3p	92	144
	hsa-miR-365	41	hsa-miR-365*	93	145, 197
20	hsa-miR-374a	42	hsa-miR-374a*	94	146
	hsa-miR-378	43	hsa-miR-378*	95	147
	hsa-miR-425	44	hsa-miR-425*	96	148
	hsa-miR-429	45	hsa-miR-429*	97	149
25	hsa-miR-449a	46	hsa-miR-449a*	98	150
	hsa-miR-449b	47	hsa-miR-449b*	99	151
	hsa-miR-449c	201	hsa-miR-449c*	202	203
30	hsa-miR-574-3p	48	hsa-miR-574-5p	100	152
	hsa-miR-92b	49	hsa-miR-92b*	101	153
	hsa-miR-939	50	hsa-miR-939*	102	154
	hsa-miR-96	51	hsa-miR-96*	103	155
35	hsa-miR-99a	52	hsa-miR-99a*	104	156
	hsa-let-7a	157	hsa-let-7a*	163	169, 198, 199
	hsa-let-7b	158	hsa-let-7b*	164	170
40	hsa-let-7c	159	hsa-let-7c*	165	171
	hsa-let-7e	160	hsa-let-7e*	166	172
	hsa-let-7f	161	hsa-let-7f*	167	173,200
45	hsa-let-7g	162	hsa-let-7g*	168	174

[0035] Les miARN selon la présente invention trouvent ainsi un intérêt particulier pour la prévention et/ou le traitement de ciliopathies dites primaires, c'est-à-dire qui sont directement associées à un dysfonctionnement des cils, ces ciliopathies primaires sont notamment :

- la dyskinésie ciliaire primaire ou syndrome de Kartagener ;
- *situs invertus* ;
- l'infertilité masculine (mobilité des spermatozoïdes) et féminine (e.g. grossesses extra-utérines) ;
- le syndrome d'Alstrom ;
- le syndrome de Bardet-Biedl ;
- le syndrome de Meckel-Gruber ;
- la polykystique des reins ;
- la dégénération rétinienne ;

- le syndrome de Senior-løken.

[0036] Les miARN selon la présente invention trouvent également un intérêt pour la prévention et/ou le traitement des ciliopathologies dites secondaires, c'est-à-dire qui sont associées à un défaut de fonctionnement des cils telles que :

- la mucoviscidose ;
- les broncho-pneumopathies obstructives chroniques (BCPO) ;
- l'asthme ;
- la bronchiolite ;
- les infections respiratoires d'origine virale.

[0037] L'utilisation selon la présente invention trouve donc plus particulièrement des applications dans la prévention et/ou le traitement des pathologies impliquant un désordre de la régénération et/ou de la différenciation de l'épithélium respiratoire ; ces pathologies sont notamment des maladies respiratoires chroniques et/ou héréditaires telles que les broncho-pneumopathies obstructives chroniques (BCPO), la mucoviscidose, l'asthme, la dyskinésie ciliaire primaire, les inflammations et infections chroniques des voies respiratoires et les insuffisances respiratoires.

[0038] Les pathologies respiratoires chroniques et/ou héréditaires (e.g. BPCO, mucoviscidose, asthme, DCP, rhinite allergique...) représentent un problème majeur de santé publique, quatrième cause de mortalité dans les pays industrialisés, et dont la prévalence est en augmentation rapide, d'où la nécessité importante de mieux appréhender les causes et les mécanismes de ces maladies afin de mieux cibler leurs traitements.

[0039] L'asthme est la plus commune des maladies respiratoires chroniques chez l'enfant (5 à 20%) et représente une des causes majeures d'hospitalisation. La recrudescence d'allergies respiratoires et l'augmentation de la pollution industrielle participent à l'augmentation importante des cas d'asthme dans la population (O van Schayck, et al. IPAG DIAGNOSIS & MANAGEMENT HANDBOOK. Chronic Airways Diseases. A Guide for Primary Care Physicians. 1-34, 2005).

[0040] Les BPCO sont un groupe de maladies respiratoires associées à une forte morbidité et à une forte mortalité. Les BPCO sont causées par des particules toxiques inhalées, dont le tabac est la plus représentative, qui vont conduire à une inflammation et à des infections chroniques fragilisant le tissu respiratoire. Environ 15% des fumeurs sont susceptibles de développer une BPCO dans leur vie. L'organisation mondiale de la santé estime qu'il existe près de 1,1 milliard de fumeurs dans le monde, avec une prévalence de BPCO de 0,8 à 6% de la population mondiale. En 2020, des études prédisent que les BPCO représenteront la troisième cause de mortalité dans le monde. Bien que les causes et les mécanismes de ces maladies demeurent largement inconnus, il est probable que d'autres facteurs (géniques, épigénétiques) soient susceptibles d'agir sur le développement de BPCO (O van Schayck, *et al.* 2005).

[0041] La mucoviscidose est la maladie génétique héréditaire la plus fréquente dans la population caucasienne (1 naissance sur 2500), affectant les glandes exocrines et donc l'ensemble du tissu épithélial sécréteur des différents organes (poumons, pancréas, foie, glandes sudoripares, intestins). Des défauts de transport d'ions à travers les épithéliums conduisent à un épaississement du mucus responsable notamment d'inflammation et d'infections respiratoires chroniques, aboutissant à une destruction tissulaire irréversible et à une insuffisance respiratoire sévère. Il n'existe aucun traitement curatif de cette maladie, mais l'avancée des connaissances scientifiques et médicales a permis d'instaurer des traitements symptomatiques qui ont fait progresser l'espérance de vie des patients de 3 ans dans les années 60 à environ 45 ans aujourd'hui.

[0042] La dyskinésie ciliaire primaire (DCP) est une maladie autosomique récessive rare (1 naissance sur 15000) causant un défaut de mobilité des cils de l'épithélium respiratoire conduisant à une clairance mucociliaire défectueuse, des inflammations et infections chroniques et une destruction tissulaire irréversible.

[0043] L'intérêt de ces miARN en vue du traitement de pathologies impliquant un désordre de la régénération et/ou de la différenciation de l'épithélium respiratoire est confirmé par la régulation par ces miARN de gènes connus pour être impliqués dans la régénération et/ou de la différenciation de l'épithélium respiratoire (voir l'exemple III ci-après).

[0044] On préfère utiliser des miARN qui sont présents en quantité significative au sein du tissu épithélial cilié au cours du processus de ciliogénèse (de préférence, dont l'abondance est d'au moins 1% des miARN totaux, voir le Tableau III) tels qu'un miARN choisi parmi hsa-miR-34a (SEQ ID N°38), hsa-miR-34b (SEQ ID N°39), hsa-miR-34c-5p (SEQ ID N°40), hsa-miR-449a (SEQ ID N°46), hsa-miR-449b (SEQ ID N°47), hsa-miR-449b* (SEQ ID N°99), hsa-miR-449c (SEQ ID N°201), hsa-miR-92b (SEQ ID N°49), hsa-miR-1975 (SEQ ID N°15), hsa-miR-99a (SEQ ID N°52), hsa-miR-191 (SEQ ID N°13), hsa-miR-378 (SEQ ID N°43), hsa-miR-23b (SEQ ID N°26), hsa-miR-125a-5p (SEQ ID N°3), hsa-miR-203 (SEQ ID N°19), hsa-miR-574-3p (SEQ ID N°48), hsa-miR-29c (SEQ ID N°32), hsa-miR-140-3p (SEQ ID N°5), hsa-miR-205 (SEQ ID N°20), hsa-miR-23a (SEQ ID N°25), hsa-miR-31 (SEQ ID N°37), hsa-miR-31* (SEQ ID N°89), hsa-miR-21 (SEQ ID N°21), hsa-miR-17 (SEQ ID N°11), hsa-miR-29a (SEQ ID N°31), hsa-miR-193b (SEQ ID N°14), hsa-miR-210 (SEQ ID N°22) et hsa-miR-130a (SEQ ID N°4), leur brin complémentaire « star » de séquence SEQ ID N°55 à 57, 63, 65 à 67, 71 à 74, 77, 78, 83, 84, 90 à 92, 95, 98, 100, 101, 104 et 202, leur brin de séquence

complémentaire éventuellement modifié chimiquement, et leurs précurseurs de SEQ ID N°107 à 109, 115, 117 à 119, 123 à 126, 129, 130, 135, 136, 141 à 144, 147, 151 à 153, 156 et 203.

[00445] Parmi ces miARN, on peut distinguer ceux dont l'expression est induite de ceux dont l'expression est réprimée (Tableau IV) ; afin de reproduire un profil d'expression de miARN comparable à celui d'un individu sain, il apparaît avantageux d'utiliser un ou plusieurs miARN dont l'expression est induite et/ou un ou plusieurs antagomirs de miARN dont l'expression est réprimée au cours du processus de ciliogénèse des tissus épithéliaux ciliés et, notamment, de régénération et de différenciation du tissu épithélial respiratoire ; un tel miARN peut être choisi parmi hsa-miR-34a (SEQ ID N°38), hsa-miR-34b (SEQ ID N°39), hsa-miR-34c-5p (SEQ ID N°40), hsa-miR-449a (SEQ ID N°46), hsa-miR-449b (SEQ ID N°47), hsa-miR-449b* (SEQ ID N°99), hsa-miR-449c (SEQ ID N°201), hsa-miR-92b (SEQ ID N°49), hsa-miR-1975 (SEQ ID N°15), hsa-miR-99a (SEQ ID N°52), hsa-miR-191 (SEQ ID N°13), hsa-miR-378 (SEQ ID N°43), hsa-miR-23b (SEQ ID N°26), hsa-miR-125a-5p (SEQ ID N°3), hsa-miR-203 (SEQ ID N°19), et leur précurseurs de séquence SEQ ID N°107, 117, 119, 123, 130, 142 à 144, 147, 150, 151, 153, 156 et 203 et/ou au moins un brin complémentaire « star » des miARN choisis parmi hsa-miR-205, hsa-miR-31, hsa-miR-21, hsa-miR-17, hsa-miR-29a, hsa-miR-193b, hsa-miR-31*, hsa-miR-210 hsa-miR-130a ; ces brins complémentaires « star » sont hsa-miR-205* (SEQ ID N°72), hsa-miR-31 et hsa-miR-31* (SEQ ID N°37 et 89), hsa-miR-21* (SEQ ID N°73), hsa-miR-17* (SEQ ID N°63), hsa-miR-29a* (SEQ ID N°83), hsa-miR-193b* (SEQ ID N°66), hsa-miR-210* (SEQ ID N°74), hsa-miR-130a* (SEQ ID N°56) et leurs précurseurs de séquence SEQ ID N°108, 115, 118, 124 à 126, 135 et 141.

[00446] Par exemple" lesdits miARN dont l'expression est modulée au cours du processus de ciliogénèse des tissus épithéliaux ciliés et, notamment, de régénération et/ou de différenciation du tissu épithélial respiratoire dont l'expression est induite sont : hsa-miR-34a (SEQ ID N°38), hsa-miR-34b (SEQ ID N°39), hsa-miR-34c-5p (SEQ ID N°40), hsa-miR-449a (SEQ ID N°46), hsa-miR-449b (SEQ ID N°47), hsa-miR-449c (SEQ ID N°201), hsa-miR-449b* (SEQ ID N°99), hsa-miR-92b (SEQ ID N°49), hsa-miR-1975 (SEQ ID N°15), hsa-miR-99a (SEQ ID N°52), hsa-miR-191 (SEQ ID N°13), hsa-miR-378 (SEQ ID N°43), hsa-miR-23b (SEQ ID N°26), hsa-miR-125a-5p (SEQ ID N°3), hsa-miR-203 (SEQ ID N°19), et leur précurseurs de séquence SEQ ID N°107, 117, 119, 123, 130, 142 à 144, 147, 150, 151, 153, 156 et 203.

[00447] L'expression des miARN identifiés peut se faire grace à des vecteurs d'expression exprimant au moins un miARN dont l'expression est induite au cours du processus de ciliogénèse d'un tissu épithélial ou au cours du processus de régénération et/ou de différenciation du tissu épithélial respiratoire. Tout vecteur d'expression capable d'exprimer des ARN dans une cellule eucaryote et dans lequel est clonée une cassette d'expression d'un miARN pourra être utilisé.

[00448] L'invention se rapporte également à l'utilisation de miARN comportant la séquence de reconnaissance GG-CAGUG (SEQ ID N°175) positionnée sur la région 2-8 du miARN, c'est-à-dire du 2^{ème} au 8^{ème} nucléotide du miARN, ou sur la région 3-9 du miARN, c'est-à-dire du 3^{ème} au 9^{ème} nucléotide du miARN ; il s'agit notamment des miARN hsa-miR-34a (SEQ ID N°38), hsa-miR-34c-5p (SEQ ID N°40), hsa-miR-449a (SEQ ID N°46), hsa-miR-449b (SEQ ID N°47) et hsa-miR-449c (SEQ ID N°201).

[00449] L'invention se rapporte aussi à l'utilisation de miARN comportant la séquence de reconnaissance AAUCACU (SEQ ID N°176) positionnée sur la région 2-8 ou sur la région 3-9 du miARN ; il s'agit notamment du miARN hsa-miR-34b (SEQ ID N°39).

[00500] L'invention se rapporte encore à l'utilisation de miARN comportant la séquence de reconnaissance AUCACUA (SEQ ID N°177) positionnée sur la région 2-8 ou sur la région 3-9 du miARN ; il s'agit notamment du miARN hsa-miR-34b (SEQ ID N°39).

[0051] Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfèrent à des exemples de mise en oeuvre de la présente invention, ainsi qu'aux figures annexées dans lesquelles :

FIGURES

[0052]

La **Figure 1** représente des clichés de cultures primaires de cellules épithéliales respiratoires humaines observées par microscopie confocale et électronique permettant d'observer la morphologie des cellules marquées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les cellules ont également été immunomarquées afin d'examiner l'expression de marqueurs épithéliaux de différenciation (tubuline- β 4 pour les cellules ciliées (**Figure 1E-F**), mucine MUC5AC pour les cellules sécrétrices à mucus (**Figure 1G-H**), et la cytokératine 13 pour les cellules basales (**Figure 1I-J**)). Les états de différenciation ont été évalués.

La **Figure 2A** représente les histogrammes cumulatifs montrant les 26 miARN ayant la plus forte expression dans l'un au moins des différents stades de différenciation de l'épithélium respiratoire humain chez 3 patients distincts : ALI-D0 (D0, prolifération), ALI-D7 (D7, prolifération et polarisation), ALI-FC (FC, début de ciliogénèse), ALI-WD (WD, épithélium pleinement différencié). La **Figure 2B** représente les histogrammes cumulatifs montrant les 22 miARN ayant la plus forte expression et étant significativement modulés dans l'un au moins des différents stades

de différenciation de l'épithélium respiratoire humain chez 3 patients distincts : ALI-D0 (D0, prolifération), ALI-D7 (D7, prolifération et polarisation), ALI-FC (FC, début de ciliogénèse), ALI-WD (WD, épithélium pleinement différencié).

La **Figure 3** représente un cluster hiérarchique obtenu par puces miARN Agilent® montrant les variations d'intensité de l'expression des miARN statistiquement exprimés ($A > 8$, $P < 0.05$) et modulés dans au moins une condition de culture cellulaire ($1 < M < -1$) (plus les cases sont foncées, moins les miARN sont exprimés) en fonction des états de différenciation des cultures cellulaires.

La **Figure 4** est un graphe montrant la corrélation entre les résultats obtenus en séquençage haut-débit (HTS) et en puces miARN (Agilent®).

La **Figure 5** représente un histogramme des variations observées par PCR quantitative des brins 5p de chacun des miARN testés à chaque stade de différenciation comme indiqué sur le graphique. Les résultats représentent la moyenne de 3 donneurs distincts.

La **Figure 6** regroupe deux graphes représentant les microARN régulés au cours de la ciliogénèse. Les diagrammes a et c représentent l'abondance des microARN en pourcentage par rapport aux microARN totaux dans des cellules HAEC non différenciées (non ciliées, stade ALI-D0) (diagramme a) et dans un explant épidermique d'embryon de Xénope avant le stade embryonnaire E11.5 (gastrula) et après le stade E26 (bourgeon caudal) (diagramme c). Les diagrammes b et d reprennent ces mêmes données et illustrent l'abondance quantitative des miRNA.

La **Figure 7** présente des clichés permettant de visualiser la localisation spécifique de miR-449 dans les cellules ciliées. Ces essais ont été réalisés par hybridation *in situ* sur des coupes congelées de culture de cellules HAEC à 21 jours (stade ALI-D21) (clichés a, b, c), de tissus bronchiques humains (clichés e, f, g) ou à partir d'embryons de Xénope au stade bourgeon caudal (clichés h, i, j, k, l) en utilisant des sondes LNA marquées à la digoxigénine et dirigées contre miR-449 (clichés a, e, f, h, i, j, l) ou contre miR-31 (cliché b) et des sondes aléatoires (« scramble ») comme contrôle négatif (clichés c, g, i). Les cellules ciliées d'embryon de Xénope ont été identifiées par un immunocyto marquage avec un anticorps primaire dirigé contre la tubuline acétylée. Les sondes LNA dirigées contre miR-449 marquent les cellules cylindriques ciliées (clichés a, e, h). Inversement, les sondes dirigées contre miR-31 ont marqué préférentiellement les cellules basales (cliché b). Les cellules muco-sécrétrices ont été marquées à l'aide d'anticorps anti-mucine MUC5AC (indiquées par des flèches dans le panneau e). Le diagramme d illustre les niveaux d'expression des miR-449, miR-31 et miR-34 dans les cellules basales du tissu épithélial des voies respiratoires humaines et dans les cellules cylindriques ciliées.

La **Figure 8** représente une cartographie (Heat-map) des microARN significativement régulés entre des cellules pyramidales (ciliées+sécrétrices) versus des cellules basales. Les 5 microARN positionnés en haut de la colonne sont spécifiques des cellules pyramidales (ciliées+sécrétrices) ; en dessous, plus les miARN apparaissent clairs, plus ils sont spécifiques des cellules basales.

La **Figure 9** est un graphe montrant les relations existant entre le $\log_2$ du ratio à deux stades de différenciation (abscisse) et la valeur de significativité statistique (ordonnées) pour chacune des comparaisons 2 à 2 indiquées sur le graphique. Les gènes significativement surexprimés sont indiqués en gris foncé (partie droite du graphe) et les gènes significativement réprimés sont indiqués en gris moyen (partie gauche du graphe).

La **Figure 10** est un histogramme montrant le $\log_2$ de l'intensité d'expression de l'ARNm de la cavéoline-1 dans chacune des conditions de cultures étudiées, comme indiqué sur le graphique.

La **Figure 11** est un histogramme montrant l'effet de chacun des miARN sélectionnés sur l'activité de la luciférase (exprimée par rapport au % de l'effet maximal obtenu avec le vecteur contrôle PSICHECK) quand le gène rapporteur de la luciférase est fusionné à la partie 3' non-codante de l'ARNm de la Cav-1 versus le contrôle (PSICHECK). Les données ont été normalisées par rapport aux résultats obtenus avec un miARN contrôle négatif.

La **Figure 12** regroupe des graphiques illustrant l'enrichissement de gènes contenant la séquence de la séquence de reconnaissance (« seed ») commun aux mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b* et mir-34c. En abscisse est représenté le nombre de gènes analysés (environ 25000) ; ces gènes sont positionnés en fonction de leur niveau de répression ou d'expression : de la gauche vers la droite, figurent les gènes du plus réprimé au plus induit. L'ordonnée représente la valeur statistique en $\log_{10}$ du niveau d'enrichissement (le score d'enrichissement reporté sur l'axe des ordonnées correspond à la valeur absolue du $\log_{10}$ de la valeur P, calculée suivant un modèle cumulatif hypergéométrique et binomial décrit par van Dongen S et al. Nat Methods. 2008 Dec;5(12):1023-5). Sur chaque graphe est indiqué le miARN qui a été transfecté dans les cellules HAECs.

La **Figure 13** représente le résultat de l'identification à l'aide du software IPA de fonctions biologiques et de maladies en relation avec les gènes trouvés modulés par l'expression des miARN selon l'invention.

La **Figure 14** illustre l'inhibition de la ciliogénèse par la suppression de l'expression de miR-449.

(a,b) les cellules HEACs sont traitées à plusieurs reprises avec des antagomirs anti-miR-449 ou un antagomir de contrôle (20 nM) au cours de leur régénération (généralement 21 jours). Le pourcentage de cellules ciliées a été défini comme le ratio du nombre de cellules positives à la -tubuline- $\beta 4$ par rapport au nombre de noyaux (20 champs/filtre et 3 filtres/donneur). Le cliché (a) représente un immunomarquage typique de cellules HAEC traitées

avec un antagomir de contrôle (Antago-Neg) ou un antagomir anti-miR-449 (Antago-449). L'histogramme indique le pourcentage de cellules ciliées par champ pour chaque condition expérimentale ($n = 6$, ***, $P < 0,001$, Student-test). Le cliché (b) montre que l'antagomir anti-miR-449 supprime l'expression des miR449a et miR-449b, en revanche, il n'a pas d'effet sur l'expression de miR-21 ($n = 6$, ns = non significatif, **, $P < 0,01$, ***, $P < 0,001$, Student-test).

Essais sur Xenope : un mélange comprenant 30 ng d'oligonucléotides morpholino (MO) de contrôle (clichés c, d, h) ou de MO miR-449a/b/c (10 ng chacun) et 2,5 ng de lysine-dextran fluorescent (FLDx, colorés en orange/marron, clichés e et f) ou 500 pg de l'ARNm de TD-tomato-CAAX pour tracer les cellules injectées (clichés g, i) est injecté dans l'épiderme d'embryons de Xenope au stade de la segmentation.

Les clichés e et f permettent la détection de progéniteurs de cellules ciliées par un marquage à la tubuline- α avec la technique d'hybridation *in situ*.

Cliché f : la région déplétée en miR-449 (haut) montre un excès de cellules positives à la tubuline- α par rapport à la région non injectée (bas). Les clichés h et i montrent la détection de cils chez les embryons au stade de têtard avec un anticorps anti-tubuline acétylée. L'image est prise dans la région de la nageoire caudale. Aucun cil n'est détecté dans les cellules co-injectées avec le MO miR-449 et l'ARNm TD-tomato-CAAX. Le graphe g représente le pourcentage de cellules injectées (positive pour la fluorescence rouge TD-tomato) qui développent des cils dans l'explant de contrôle (225 cellules, 8 queues) et dans celui modifié avec le MO miR-449 (242 cellules, 8 queues, $p = 0,036$, test de Kruskal-Wallis).

La **Figure 15** illustre l'induction de la spécialisation des cellules ciliées par la suppression de miR-449. Un mélange de MO anti-miR-449 ou de MO contrôle et de FLDx est injecté dans l'épiderme d'embryons au stade de la segmentation. Les embryons sont fixés au stade neurula précoce puis soumis à une hybridation *in situ* avec des ribosomes de tubuline- α , Tex15 et Foxj1, ils sont ensuite immunomarkés pour révéler la présence de FLDx (lysine-dextran fluorescente). Les embryons ont ensuite été sectionnés pour mieux visualiser la densité de progéniteurs des cellules ciliées dans les domaines injectés. Pour les trois marqueurs, la suppression de l'expression des miR-449 a conduit à une augmentation des progéniteurs des cellules ciliées.

Les quatre sections de la **Figure 16** illustrent les résultats d'enrichissement des gènes comme expliqué sur le site <http://www.broadinstitute.org/gsea/doc/GSEAUUserGuideFrame.html>. Le GSEA calcule un score d'enrichissement (ES) qui reflète le degré auquel un gène est surexprimé au sein d'une liste de gènes donnés. Un ES positif indique l'enrichissement d'un gène à gauche de l'ensemble des gènes (correspondant à un gène sur-régulé), un ES négatif indique l'enrichissement d'un gène à droite dudit ensemble de gènes (correspondant à un gène sous-régulé). Pour chaque section, le panneau du haut est une représentation graphique du score d'enrichissement d'un ensemble de gènes comme indiqué sur la gauche. La partie du milieu du panneau montre où les membres de l'ensemble de gènes apparaissent dans la liste (« cycle cellulaire » ou « ciliogénèse »). La partie basse du panneau montre la valeur d'ordonnement métrique qui mesure la corrélation entre l'expression d'un gène et le phénotype cellulaire ; une valeur positive indique une corrélation avec le premier phénotype (différenciation ou surexpression des miR-449) et une valeur négative indique une corrélation avec le second phénotype (non différencié ou contrôle). Toutes ces données expérimentales sont stockées dans la Base Gene Expression Omnibus sous le numéro d'accèsion GSE22147.

La **Figure 17** présente les résultats montrant que miR-449 cible le cycle cellulaire et la voie Notch.

Cycle cellulaire : le graphe (a) représente la modulation de l'activité du gène rapporteur de la luciférase fusionné à la partie 3' non codantes de l'ARNm de *Areg*, *Ccnb1*, *Ccne2*, *Cdc25a* par miR-449a/b et miR-34a/c5-p.

Voie de signalisation Notch : Le graphe (c) représente la modulation de l'activité du gène rapporteur de la luciférase fusionné à la partie 3' non codantes de l'ARNm de *DLL1* et *Notch1* par miR-449a/b et miR-34a/c5-p.

Toutes les expériences ont été effectuées au moins deux fois en trois exemplaires. Les valeurs ont été normalisées au contrôle interne de luciférase de Renilla. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

Le graphe (b) représente le blocage du cycle cellulaire en phase G1 par miR-449 et miR-34.

Le graphe (d) représente l'impact de l'inhibition de la voie Notch par DAPT (10 μ M) sur la ciliogénèse des cellules HAECs.

Les clichés (e) et (f) représentent des embryons au stade de segmentation dont l'épiderme a reçu une injection d'un mélange de MO anti-miR-449 et de lysine-dextran fluorescent (FLDx).

Une coloration par hybridation *in situ* révèle l'expression soutenue de *DLL1* dans l'épiderme déficient en miR-449. Le panneau (g) montre des embryons au stade de la segmentation dont l'épiderme a reçu une injection de MO de contrôle, de MO anti-miR-449 et de MO *Dll1* ou d'ARNm *DLL1*. Les cils ont été colorés avec un anticorps anti-tubuline acétylée (en rouge). Pour chaque condition, au moins 200 cellules positives au FLDx (en vert), sur 6 à 8 queues, présentent des cils ($P < 0,03$). Il convient de noter que l'injection d'ARNm de *Dll1* supprime la ciliogénèse, bien qu'elle augmente le nombre de progéniteurs des cellules ciliées. L'extinction de l'expression de *Dll1* induit la ciliogénèse.

EXEMPLES**I- Préparation du modèle cellulaire biologique****I-A. cellules épithéliales respiratoires humaines**

[0053] Les essais ont été réalisés avec des cultures primaires de cellules épithéliales respiratoires humaines saines isolées à partir de cornets ou de polypes nasaux collectés chez des patients devant subir une septoplastie, une turbinectomie ou une polypectomie. Les cellules ont ensuite été cultivées sur support poreux recouvert de collagène de type IV (Transwell® clear, polyester, 0.4 µm, Costar) en interface air-liquide (ALI) dans le but d'induire la différenciation (Puchelle, E *et al.*, 2006). Les caractéristiques morphologiques et physiologiques de l'épithélium respiratoire ont été par ailleurs bien décrites (Puchelle, E *et al.*, 2006).

I-A.1. Matériels et méthodes**Patients et échantillons tissulaires**

[0054] Des cornets inférieurs ou des polypes nasaux ont été collectés à partir de 3 patients devant subir une turbinectomie ou des polypectomies pour obstruction nasale ou septoplastie (Dr. Castillo, Département ORL, Hôpital Pasteur, Nice, France). Les patients atteints d'asthme, de mucoviscidose ou d'allergies ont été exclus de l'étude. Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Nice-Sophia-Antipolis.

Isolement et culture de cellules épithéliales respiratoires humaines saines (HAECs)

[0055] Les cultures primaires de HAECs saines dérivées de muqueuse nasale ont été réalisées à l'aide d'une méthode adaptée d'études précédentes (Wu *et al.*, 1985; Marcet *et al.*, 2007; LeSimple *et al.*, 2007). Après excision, le tissu est immédiatement immergé dans une solution équilibrée en sels (HBSS (sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) Invitrogen) contenant de l'HEPES (25 mM, Invitrogen), 100 U/ml pénicilline (Gibco, Invitrogen), 100 mg/ml streptomycine (Gibco, Invitrogen), 100 mg/ml de sulfate de gentamicine (Gibco, Invitrogen), et 2,5 mg/ml d'amphotéricine B (Gibco, Invitrogen). Après 3 rinçages avec du milieu HBSS-HEPES-antibiotiques, le tissu est digéré avec 0,1% de pronase (Sigma) à 4°C, toute la nuit. Le tissu est ensuite délicatement retiré du milieu de digestion, et les cellules épithéliales respiratoires à la surface de la muqueuse nasale sont détachées du stroma par de légères agitations avec du milieu HBSS-HEPES-antibiotiques contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF). La suspension cellulaire est centrifugée à 150g, 10 min à 4°C et le culot cellulaire est resuspendu dans 10% SVF-HBSS-HEPES-antibiotiques et centrifugé à nouveau. Le second culot cellulaire est alors resuspendu dans un milieu 10% SVF-antibiotiques-Dulbecco's modified Eagle's (DMEM, Invitrogen) à l'aide d'une aiguille (0,8 mm) et d'une seringue de 10 ml pour dissocier les agrégats cellulaires. Les cellules sont ensuiteensemencées ($10^4/\text{cm}^2$) sur des supports poreux perméables (Transwell®, Costar, Sigma) recouverts de collagène de type IV (Sigma) et incubées dans une atmosphère humidifiée à 37°C, 5% CO_2 . Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu de prolifération (BEGM) reconstitué à l'aide du milieu BEBM (Lonza) contenant les suppléments hormonaux et autres facteurs de croissances suivants : insuline, apo-transferrine, facteur de croissance épidermique (EGF), épinéphrine, hydroxycortisone, 3,30,5-triiodothyronine, supplément de croissance pour cellules endothéliales (endothelial cell growth supplement), acide rétinolique (à faible concentration, environ 10 nM), amphotéricine B (2,5 mg/ml), streptomycine (100 mg/ml), pénicilline (100 U/ml), sulfate de gentamicine (50 mg/ml) et L-glutamine (2 mM).

[0056] La confluence de la monocouche de cellules épithéliales respiratoires est typiquement achevée après 7 jours de culture. Le milieu de surface apicale est alors retiré afin de mettre les cellules en interface air-liquide et le milieu basolatéral est changé par du milieu de différenciation : BEBM/DMEM ratio (1 : 1) et contenant les mêmes suppléments que cités ci-dessus mis à part l'acide rétinolique qui est cette fois ajouté à forte concentration, environ 300 nM, pour induire la différenciation mucociliaire de l'épithélium respiratoire. Les expériences sont ensuite réalisées sur des cultures différenciées ayant une résistance transépithéliale supérieure à 500 ohm/cm².

Marquage immunocytochimique et microscopie confocale et électronique

[0057] Les coupes de membranes de cultures de cellules respiratoires cultivées en interface air-liquide sont fixées dans l'acétone ou dans le méthanol (10 min, -20°C). Après rinçage dans du PBS, les sites non-spécifiques sont bloqués dans du PBS-BSA 3%, puis l'anticorps primaire est incubé dans du PBS-BSA-1% de 1h à température ambiante à 16h à 4°C selon l'anticorps utilisé. Après rinçage, l'anticorps secondaire couplé et mis en solution dans du PBS-BSA 1% est incubé 1 h à température ambiante. Après rinçage, les noyaux sont marqués au DAPI et contre colorés à l'hématoxyline de Harris. Après rinçage, les lames sont montées et observées au microscope confocal. Dans le cas de doubles mar-

quages séquentiels impliquant deux anticorps de souris, une étape de blocage des sites libres des anticorps primaires est réalisée à l'aide d'anticorps anti-souris anti-Fab (H+L) 30 minutes à température ambiante.

[0058] Pour la microscopie électronique, les cellules sont fixées dans du tampon phosphate monosodique 0.1M contenant 1,6% de glutaraldéhyde.

Tri des cellules épithéliales respiratoires

[0059] Après dissociation du stroma de polypes nasaux, les cellules épithéliales (environ $20 \cdot 10^6$) sont incubées en PBS-BSA-EDTA pendant 30 min puis incubées avec l'anticorps marqué CD151-PE et l'anti-FT (facteur tissulaire)-FITC pendant 20 min, 4°C (voir Hajj, R. et al., Stem Cells 25, 139-148 (2007)). Après deux lavages, les cellules sont reprises dans du PBS-EDTA et incubées avec du DAPI pour marquer les cellules dont l'intégrité est altérée.

[0060] Le tri cellulaire a été effectué sur le trieur FACS Aria (BD Biosciences) équipé de 3 lasers, bleu, rouge et violet. Les cellules mortes, les agrégats et les doublets cellulaires ont été exclus. La population doublement positive de cellules basales (CD151+/FT+) et la population négative de cellules cylindriques (contenant les cellules ciliées et les cellules sécrétrices de mucus) (CD151-/FT-) ont été sélectionnées et triées à la vitesse de 5000 événements/s (30 MHz de fréquence). La pureté et l'identité des cellules triées ont ensuite été vérifiées par cytomètre et immunocytochimie.

I-A.2. Observation de la morphologie des cellules marquées à l'hématoxyline et à l'éosine

[0061] Des immunomarquages ont été réalisés afin d'examiner l'expression de marqueurs épithéliaux de différenciation (tubuline- $\beta 4$ pour les cellules ciliées (**Figure 1E-F**), mucine MUC5AC pour les cellules sécrétrices à mucus (**Figure 1G-H**), et la cytokératine 13 pour les cellules basales (**Figure 1I-J**)).

[0062] Les états de différenciation ont été évalués par microscopie confocale et électronique. Il a été choisi d'étudier quatre temps clés de la différenciation :

(1) durant les premiers jours de l'établissement de l'interface air-liquide (ALI-D0), les cellules prolifèrent et forment un épithélium squameux stratifié;

(2) après 5-7 jours d'interface air-liquide (ALI-D7), la polarisation cellulaire débute;

(3) après environ 14 jours d'interface air-liquide, les cellules forment un épithélium pseudostratifié où les premiers cils apparaissent à la surface des cellules (ALI-FC), ainsi qu'un allongement cellulaire, indiquant le début de la ciliogénèse (**Figure 1C**);

(4) après environ 21 jours d'interface air-liquide (ALI-WD), l'épithélium respiratoire devient pseudostratifié, stade complètement différencié où la plupart des cellules sont cylindriques et ciliées, avec une couche sous-jacente de cellules basales, ainsi que des cellules sécrétrices de mucus (**Figure 1D**).

[0063] Après 3-4 semaines de culture, les critères morphologiques et les marqueurs spécifiques de différenciation des 3 types cellulaires de l'épithélium respiratoire de surface (i.e. basales (**Figure 1I-J**), sécrétrices (**Figure 1G-H**), et ciliées (**Figure 1E-F**) peuvent être observés.

II- Mesure de l'expression des miARN dans les cellules sélectionnées au cours de la ciliogénèse

[0064] Les techniques de séquençage à haut-débit permettent d'établir l'abondance de certains miARN au sein d'un mélange complexe.

[0065] Sur la base du nombre de séquences spécifiques d'un miARN au sein d'une condition expérimentale, il est possible d'évaluer l'abondance dudit miARN au sein de l'ensemble des miARN.

II-1. Matériels et méthodes

Cellules épidermiques ciliées d'embryons de *Xenopus laevis*

[0066] L'épiderme cilié des embryons de *Xenopus laevis* est utilisé comme un modèle d'épithélium mucociliaire comme décrit par Hayes et al. (Dev Biol 312 (1), 115 (2007)).

Extraction d'ARN totaux et contrôles qualité

[0067] Les ARN totaux ont été extraits à partir des HAECs cultivées en interface air-liquide à quatre stades de différenciation : ALI-D0 (0 jour), ALI-D7 (7 jours), ALI-FC (lors de l'apparition des premiers cils à environ 14 jours) et ALI-WD (pleinement différenciées à environ 21 jours). Les cellules sont lysées dans du réactif au Trizol® (Invitrogen).

Les ARN totaux contenant les petits ARN et les microARN sont purifiés sur colonnes Qiagen RNEasy (Qiagen) selon les instructions du fournisseur.

[0068] La pureté et la concentration des échantillons d'ARN totaux sont d'abord évalués en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop. Les ratios 260/280 (ratio des valeurs d'absorbance à 260 et 280 nm d'un échantillon mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre) et 260/230 (ratio des valeurs d'absorbance à 260 et 230 nm d'un échantillon mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre) ; ces ratios reflètent la pureté en ARN lorsqu'ils sont compris entre 1,5 et 2 ; ils sont vérifiés et doivent avoir une valeur proche de 2.

[0069] Les ARN totaux de cellules embryonnaires de *Xenope* ont été purifiés avec un kit "Qiagen RNeasy kit" (Qiagen).

[0070] Les ARN sont ensuite chargés sur une puce « RNA nano chip » (Agilent Technologie, France) et leur qualité (intégrité et niveau de dégradation des ARN) est analysée à l'aide du Bioanalyzer System (Agilent Technologies, France).

Séquençage haut-débit de microARN

[0071] Les ARN totaux contenant les petits ARN et les microARN sont isolés comme précédemment. La procédure est basée sur la technologie Applied Biosystems Ligase-Enhanced Genome Detection (LEGenD™) ; le kit SOLiD™ Small RNA Expression (Applied Biosystems, France) a été utilisé. Cette méthode permet de convertir les petits ARN d'un échantillon dans une librairie d'ADN double brin ; elle a été développée par Applied Biosystems SOLiD™ System pour faire du séquençage haut-débit de nouvelle génération.

[0072] Le séquençage haut-débit des microARN a été réalisé selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les ARN totaux contenant les petits ARN sont hybridés (65°C, 10 min, puis à 16°C, 5 min) et ligués (16°C, 2-16 h dans un thermocycleur) à l'Adaptor Mix A pour produire une matrice pour le séquençage de l'extrémité 5' des petits ARN, ou à l'Adaptor Mix B pour séquencer l'extrémité 3'. Les échantillons sont ensuite reverse-transcrits (42°C, 30 min) pour synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc). L'amplification de la bibliothèque des petits ARN est effectuée par PCR et après migration sur gel de polyacrylamide les petits ARN amplifiés sont découpés et extraits du gel suivant leur taille (environ 105-150 bases de longueur, selon les instructions du fournisseur), élués et resuspendus dans de l'eau exempte de nucléases. La concentration d'acides nucléiques est ensuite mesurée et normalisée avant de procéder à la préparation des échantillons pour le séquençage.

Analyses statistiques des données de séquençage haut-débit

[0073] Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R de Bioconductor® (Peter Dalgaard, statistics and computing, Introductory statistics with R. Springer, 2002 ; R. Gentleman, V.J. Carey, W. Huber, R.A. Irizarry, S. Dudoit. Statistics for biology and health. Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor. Springer, 2005).

[0074] Pour chaque microARN séquençé, le nombre de séquences du brin 5p et du brin 3p du microARN a été normalisé à 10⁶ séquences et converti en pourcentage d'abondance d'expression pour chacun des microARN. Les données ont ensuite été normalisées suivant un modèle linéaire et une méthode Bayésienne empirique en utilisant le logiciel R. Pour les analyses ultérieures, n'ont été retenus que les microARN dont le pourcentage d'expression (ou abondance) est supérieure à 1% du total des microARN dans au moins une condition de culture, avec un |Log₂ Ratio| inférieur à 0,5 et une P-Value ajustée inférieure à 0,05.

Analyse du microARNome par puces microARN (Agilent Technologies)

[0075] En parallèle du séquençage haut-débit des microARN, le répertoire d'expression des microARN (microARNome) est étudié à l'aide de la technologie de puces microARN Agilent®. Pour cela, les échantillons ARN des mêmes patients que précédemment ont été utilisés, marqués et hybridés sur puces miARN Agilent® (Human miRNA Microarray v2, contenant 866 miARN humains et 89 miARN viraux humains, i.e. l'ensemble des miARN humains contenus et référencés dans Sanger miRBase v.12.0, Agilent Technologies, France) à l'aide du kit « miRNA labelling and hybridization » suivant les instructions du fournisseur (Agilent Technologies).

Analyses du transcriptome par puces ADN (Affymetrix®)

[0076] Pour les analyses du transcriptome, les ARN totaux sont purifiés et leur qualité est vérifiée comme précédemment.

[0077] L'analyse est ensuite réalisée sur des puces ADN GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix®). Chacun des 28869 gènes est représenté sur la puce par environ 26 sondes recouvrant la longueur entière du gène. Les ARN totaux sont marqués et hybridés à l'aide de "whole Transcript (WT) Sense Target Labeling and Control Reagents, fluidics and scanning instrumentation and basic analysis software".

Analyses des données de transcriptome obtenues par puces ADN (Affymetrix®)

[0078] Les analyses de données sont réalisées à l'aide du logiciel R Bioconductor développé par le consortium statistique R. Puis, les données sont visualisées à l'aide de l'interface Mediant, un système d'information développé pour l'analyse et le stockage d'informations à large échelle obtenues lors d'analyses de puces (Le Brigand and Barbry, 2007).

[0079] Pour les puces Affymetrix®, les données sont analysées en utilisant l'algorithme RMA (Robust Multi-Chip Average), qui réalise une correction du bruit de fond, une étape de normalisation, et un compte-rendu des niveaux des sondes. Cette méthode montre une précision élevée, particulièrement pour des valeurs d'expression faibles, et montre une spécificité et une sensibilité plus élevée que de nombreuses autres méthodes connues (Irizarry *et al.*, 2003). Les données sont normalisées suivant un modèle linéaire et une méthode Bayésienne empirique à l'aide du logiciel R Bioconductor. Des graphiques en forme de Volcano plots (Figure 7) sont utilisées pour montrer le niveau de régulation quantitatif des gènes exprimé en log2 en fonction de leur significativité statistique par rapport à des répliques expérimentaux.

Hybridation *in situ*

[0080] Après fixation dans du paraformaldéhyde à 4% (Electron Microscopy Sciences), des coupes congelées de cultures cellulaires au stade ALI-D21 ou de tissus des voies respiratoires de l'homme ont été acétylées, incubées une nuit à 55°C avec 0,3 ng/μl de sondes LNA marquées avec la digoxigénine ciblant des microARN (Exiqon, Woburn, MA) dans du formamide désionisée 50%, 0,3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 10 mM NaPO4 pH 8,0, 10% sulfate de dextran, 1X de solution de Denhardt, et de 0,5 mg/ml d'ARN de levure.

[0081] Les séquences des sondes sont :

pour miR-449 : ccagctaacaatacactgcc (SEQ. ID. N°204)

pour miR-31: agctatgccagcatcttgcct (SEQ. ID. N°205)

pour le microARN de contrôle négatif (« scramble ») : gtgtaacacgtctatcgccca (SEQ. ID. N°206).

[0082] Les sondes ont été révélées par incubations séquentielles à la peroxydase conjuguée avec des anticorps anti-digoxigénine (Roche) avec le kit d'amplification de signal « Tyramide Signal Amplification Plus DNP AP System » (Perkin Elmer) sur le substrat BCIP/NBT (DakoCytomation).

[0083] Certaines lames ont ensuite été exposées à des anticorps de souris anti-MUC5AC et révélées avec le kit « LSAB2 System-HRP » (Dako). Les coupes ont été contre-marquées avec le colorant éosine/safran « Nuclear Fast Red », et montées à l'aide milieu de montage Eukitt (Electron Microscopy Sciences).

[0084] Chez le Xenope, des oeufs obtenus de femelles NASCO sont fécondés *in vitro*, cultivés et injectés tel que décrit par Marchal, L et al. (Proc Natl Acad Sci U S A 106 (41), 17437 (2009)). Les ARNc de Dll1 et de la centrin-2-GFP sont préparées avec le kit « Ambion mMessage Machine ». le vecteur Td-tomato-CAAX lié à la membrane (don de Chenbei Chang) est linéarisé avec l'Asel et l'ARNc est synthétisé avec la Sp6 polymérase. La lysine-dextran fluorescente (FLDx, 2.5 ng/cellule) est co-injectée avec les oligonucléotides morpholino (MO) pour marquer les embryons vivants et une immunodétection anti-fluorescéine est réalisée pour suivre la distribution des MO dans les embryons. Toutes les injections sont dupliquées.

Une sonde LNA anti-miR-449a marquée à la mono-digoxigénine (Exiqon) a été utilisée pour l'hybridation *in situ* qui a été réalisée comme décrit par Kloosterman et al. (Nat Methods 3 (1), 27 (2006)). Des sondes ribosomiques antisens de la tubulin-α, Dll1, Tex15 et Foxj1 ont été préparées comme décrit par : Deblandre et al. (Development 126 (21), 4715 (1999)) pour la tubulin-α et Dll1 ; Hayes et al. (Dev Biol 312 (1), 115 (2007)) pour Tex15 et Pohl et al. (Dev Genes Evol 214 (4), 200 (2004)) pour Foxj1.

II-2. Expression des miRNA dans les cellules sélectionnéesII-2.A. cellules HAECs

[0085] Sur l'ensemble des miARN humains connus aujourd'hui (environ 750), les Inventeurs ont ainsi trouvé dans un premier temps à l'aide de la technique de séquençage haut-débit (HTS) de miARN que 115 miARN se retrouvaient exprimés au cours de la différenciation avec une valeur d'intensité supérieure à 8 (correspondant au Log2 du nombre normalisé de miARN séquencés).

[0086] A l'aide de la technique de séquençage, il est possible de rendre compte de l'abondance en pourcentage de chacun des miARN séquencés. Les Inventeurs ont ainsi pu établir de manière surprenante que 26 miARN étaient présents au sein des différents stades de différenciation de l'épithélium respiratoire humain avec une abondance supérieure à 1% (indiqués dans la **Figure 2** et le **Tableau IIIA** ci-dessous).

[0087] Les 26 miARN identifiés couvrent à eux-seuls de l'ordre de 80% de tous les miARN exprimés dans l'épithélium respiratoire humain ; cette quantité montre leur implication dans le processus de régénération et/ou de différenciation du tissu épithélial respiratoire.

[0088] Une analyse plus fine de ces 26 miARN montre que 22 sont significativement régulés dans au moins un des quatre stades de différenciation de l'épithélium respiratoire humain et représentent environ 70 % du total des miARN : 13 miARN sont surexprimés tandis que 9 miARN sont réprimés (voir la Figure 2B et le **Tableau IV** ci-après).

[0089] La valeur de modulation (aussi désignée ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation) est calculée par la différence entre les niveaux d'intensité d'expression en log2 aux deux stades de différenciation indiqués en haut de chaque colonne.

Tableau IIIA. miARN significativement exprimés dans l'épithélium respiratoire humain et avec une abondance supérieur à 1% à au moins un stade de différenciation, identifiés par séquençage de miARN haut-débit (HTS).

Niveau d'intensité d'expression en log2			Abondance (%)				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation)							
Nom	Pre-mir	brins	D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0
hsa-miR-449a	hsa-mir-449a	5p	4,48	9,69	14,90	15,11	0,00	0,18	6,49	5,70	5,21	5,21	0,21	10,63
hsa-miR-449b	hsa-mir-449b	5p	3,64	6,96	12,36	12,24	0,00	0,03	1,12	0,78	3,32	5,40	-0,12	8,60
hsa-miR-449b*	hsa-mir-449b	3p	6,40	10,23	13,59	13,84	0,02	0,26	2,62	2,37	3,83	3,36	0,26	7,45
hsa-miR-449c	hsa-mir-449c		1,54	4,13	11,57	10,98	0,00	0,00	0,32	0,20	2,59	7,44	-0,59	9,44
hsa-miR-34b	hsa-mir-34b	3p	7,01	8,26	12,43	13,75	0,03	0,07	1,17	2,22	1,25	4,17	1,32	6,74
hsa-miR-34c-5p	hsa-mir-34c	5p	7,88	9,21	13,23	14,29	0,05	0,13	2,05	3,23	1,33	4,02	1,06	6,41
hsa-miR-92b	hsa-mir-92b	3p	7,49	8,70	12,82	13,42	0,04	0,09	1,54	1,77	1,21	4,12	0,60	5,93
hsa-miR-1975	hsa-mir-1975	3p	11,08	13,22	13,55	14,01	0,48	2,09	2,56	2,67	2,13	0,34	0,46	2,93
hsa-miR-99a	hsa-mir-99a	5p	9,77	11,19	11,96	12,65	0,19	0,52	0,85	1,03	1,43	0,77	0,69	2,88
hsa-miR-191	hsa-mir-191	5p	14,67	15,57	16,40	16,82	5,71	10,68	18,46	18,69	0,90	0,84	0,42	2,15
hsa-miR-378	hsa-mir-378	3p	10,37	12,53	12,26	11,87	0,29	1,30	1,04	0,61	2,15	-0,26	-0,39	1,50
hsa-miR-23b	hsa-mir-23b	3p	14,06	15,35	15,18	15,35	3,73	9,19	7,92	6,72	1,30	-0,17	0,16	1,29
hsa-miR-125a-5p	hsa-mir-125a	5p	12,92	13,55	13,29	14,08	1,69	2,64	2,13	2,79	0,64	-0,27	0,79	1,16
hsa-miR-203	hsa-mir-203	3p	13,49	13,60	13,39	14,57	2,53	2,73	2,29	3,92	0,11	-0,21	1,18	1,08
hsa-miR-574-3p	hsa-mir-574	3p	13,64	14,12	14,24	14,56	2,80	3,92	4,12	3,90	0,48	0,12	0,32	0,92
hsa-miR-29c	hsa-mir-29c	3p	13,66	14,48	14,50	14,53	2,84	5,03	4,95	3,82	0,82	0,02	0,03	0,87

(suite)

Nom	Pre-mir	brins	Niveau d'intensité d'expression en log2				Abondance (%)				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation)			
			D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0
hsa-miR-140-3p	hsa-mir-140	3p	12,39	12,72	13,08	13,12	1,17	1,48	1,85	1,44	0,33	0,37	0,04	0,73
hsa-miR-205	hsa-mir-205	5p	14,61	15,23	14,11	14,55	5,48	8,43	3,76	3,87	0,62	-1,12	0,44	-0,06
hsa-miR-23a	hsa-mir-23a	3p	14,42	14,47	13,67	14,10	4,79	4,99	2,77	2,83	0,06	-0,80	0,43	-0,31
hsa-miR-31	hsa-mir-31	5p	13,69	13,31	12,40	12,74	2,89	2,24	1,15	1,10	-0,37	-0,91	0,34	-0,95
hsa-miR-21	hsa-mir-21	5p	16,40	15,66	14,50	15,24	19,01	11,41	4,94	6,26	-0,74	-1,16	0,74	-1,16
hsa-miR-17	hsa-mir-17	5p	12,85	12,68	11,81	11,61	1,61	1,44	0,76	0,50	-0,17	-0,87	-0,20	-1,24
hsa-miR-29a	hsa-mir-29a	3p	16,24	14,90	14,79	14,81	17,01	6,72	6,02	4,64	-1,34	-0,11	0,02	-1,43
hsa-miR-193b	hsa-mir-193b	3p	13,26	12,09	11,19	11,67	2,16	0,96	0,50	0,52	-1,17	-0,90	0,48	-1,60
hsa-miR-31*	hsa-mir-31	3p	13,56	12,91	11,60	11,83	2,64	1,69	0,66	0,59	-0,65	-1,31	0,24	-1,73
hsa-miR-210	hsa-mir-210	3p	12,29	11,33	10,60	10,49	1,10	0,57	0,33	0,23	-0,96	-0,74	-0,10	-1,80
hsa-miR-130a	hsa-mir-130a	3p	13,91	12,51	12,71	11,98	3,38	1,28	1,42	0,65	-1,40	0,19	-0,73	-1,94

Tableau IV. miARN significativement exprimés et modulés au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire, avec une abondance supérieur à 1% identifiés par séquençage de miARN haut-débit (HTS).

Nom	Pre-mir	brins	Niveau d'intensité d'expression en log2				Abondance (%)				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation)			
			D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0
hsa-miR-449a	hsa-mir-449a	5p	4,48	9,69	14,90	15,11	0,00	0,18	6,49	5,70	5,21	5,21	0,21	10,63
hsa-miR-449b	hsa-mir-449b	5p	3,64	6,96	12,36	12,24	0,00	0,03	1,12	0,78	3,32	5,40	-0,12	8,60
hsa-miR-449b*	hsa-mir-449b	3p	6,40	10,23	13,59	13,84	0,02	0,26	2,62	2,37	3,83	3,36	0,26	7,45
hsa-miR-449c	hsa-mir-449c		1,54	4,13	11,57	10,98	0,00	0,00	0,32	0,20	2,59	7,44	-0,59	9,44
hsa-miR-34b	hsa-mir-34b	3p	7,01	8,26	12,43	13,75	0,03	0,07	1,17	2,22	1,25	4,17	1,32	6,74
hsa-miR-34c-5p	hsa-mir-34c	5p	7,88	9,21	13,23	14,29	0,05	0,13	2,05	3,23	1,33	4,02	1,06	6,41
hsa-miR-92b	hsa-mir-92b	3p	7,49	8,70	12,82	13,42	0,04	0,09	1,54	1,77	1,21	4,12	0,60	5,93
hsa-miR-1975	hsa-mir-1975	3p	11,08	13,22	13,55	14,01	0,48	2,09	2,56	2,67	2,13	0,34	0,46	2,93
hsa-miR-99a	hsa-mir-99a	5p	9,77	11,19	11,96	12,65	0,19	0,52	0,85	1,03	1,43	0,77	0,69	2,88
hsa-miR-191	hsa-mir-191	5p	14,67	15,57	16,40	16,82	5,71	10,68	18,46	18,69	0,90	0,84	0,42	2,15
hsa-miR-378	hsa-mir-378	3p	10,37	12,53	12,26	11,87	0,29	1,30	1,04	0,61	2,15	-0,26	-0,39	1,50
hsa-miR-23b	hsa-mir-23b	3p	14,06	15,35	15,18	15,35	3,73	9,19	7,92	6,72	1,30	-0,17	0,16	1,29
hsa-miR-125a-5p	hsa-mir-125a	5p	12,92	13,55	13,29	14,08	1,69	2,64	2,13	2,79	0,64	-0,27	0,79	1,16
hsa-miR-203	hsa-mir-203	3p	13,49	13,60	13,39	14,57	2,53	2,73	2,29	3,92	0,11	-0,21	1,18	1,08
hsa-miR-205	hsa-mir-205	5p	14,61	15,23	14,11	14,55	5,48	8,43	3,76	3,87	0,62	-1,12	0,44	-0,06
hsa-miR-31	hsa-mir-31	5p	13,69	13,31	12,40	12,74	2,89	2,24	1,15	1,10	-0,37	-0,91	0,34	-0,95
hsa-miR-21	hsa-mir-21	5p	16,40	15,66	14,50	15,24	19,01	11,41	4,94	6,26	-0,74	-1,16	0,74	-1,16

(suite)

Nom	Pre-mir	brins	Niveau d'intensité d'expression en log2				Abondance (%)				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation)			
			D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0
hsa-miR-17	hsa-mir-17	5p	12,85	12,68	11,81	11,61	1,61	1,44	0,76	0,50	-0,17	-0,87	-0,20	-1,24
hsa-miR-29a	hsa-mir-29a	3p	16,24	14,90	14,79	14,81	17,01	6,72	6,02	4,64	-1,34	-0,11	0,02	-1,43
hsa-miR-193b	hsa-mir-193b	3p	13,26	12,09	11,19	11,67	2,16	0,96	0,50	0,52	-1,17	-0,90	0,48	-1,60
hsa-miR-31*	hsa-mir-31	3p	13,56	12,91	11,60	11,83	2,64	1,69	0,66	0,59	-0,65	-1,31	0,24	-1,73
hsa-miR-210	hsa-mir-210	3p	12,29	11,33	10,60	10,49	1,10	0,57	0,33	0,23	-0,96	-0,74	-0,10	-1,80
hsa-miR-130a	hsa-mir-130a	3p	13,91	12,51	12,71	11,98	3,38	1,28	1,42	0,65	-1,40	0,19	-0,73	-1,94

[0090] Les Inventeurs ont ensuite utilisé les puces miARN Agilent pour étudier le répertoire d'expression des miARN de l'épithélium respiratoire humain et comparer les résultats obtenus en séquençage haut-débit avec ceux obtenus avec des puces commerciales miARN Agilent®. A l'aide de cette technique, 48 miARN sont retrouvés significativement exprimés et modulés ($\log_2$ du niveau d'intensité de l'expression > 8 ; $1 < \log_2(\text{ratio}) < -1$ et une valeur P ajustée $< 0,05$) dans au moins un des quatre stades de différenciation (voir la **Figure 3** et le **Tableau V**).

Tableau V. miARN significativement exprimés et modulés au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire identifiés par puces miARN Agilent®

Nom	Niveau d'intensité d'expression en $\log_2$				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en $\log_2$ à deux stades de différenciation)			
	D0	D7	FC	WD	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0
hsa-miR-449a	1,47	8,00	13,70	13,54	6,53	5,70	-0,15	12,08
hsa-miR-449b	0,47	3,08	9,33	9,11	2,61	6,25	-0,22	8,64
hsa-miR-34b	0,77	3,65	8,13	8,94	2,88	4,48	0,81	8,17
hsa-miR-34c-5p	3,94	6,29	10,56	11,39	2,35	4,27	0,82	7,44
hsa-miR-34b*	5,96	7,98	11,35	12,44	2,02	3,36	1,10	6,48
hsa-miR-99a	5,02	7,35	8,12	8,31	2,33	0,77	0,19	3,28
hsa-miR-30b	7,62	9,98	10,03	10,17	2,36	0,05	0,15	2,55
hsa-miR-768-3p	7,43	9,51	9,81	9,96	2,08	0,30	0,14	2,53
hsa-miR-30e	6,73	9,50	9,25	9,12	2,76	-0,25	-0,13	2,38
hsa-miR-200a	8,64	10,58	10,79	10,84	1,94	0,20	0,06	2,20
hsa-miR-26a	8,50	10,70	10,59	10,65	2,20	-0,11	0,06	2,15
hsa-miR-200b	9,93	11,94	11,87	12,04	2,01	-0,07	0,17	2,11
hsa-miR-429	7,97	9,68	9,82	9,93	1,71	0,14	0,10	1,95
hsa-miR-34a	8,58	10,89	10,35	10,49	2,31	-0,54	0,13	1,91
hsa-miR-141	11,15	13,31	13,03	13,03	2,16	-0,28	0,00	1,88
hsa-miR-15a	7,74	10,10	9,71	9,61	2,36	-0,39	-0,10	1,87
hsa-miR-30d	7,06	8,94	8,88	8,92	1,88	-0,06	0,05	1,86
hsa-miR-23b	8,92	10,88	10,61	10,64	1,96	-0,27	0,04	1,72
hsa-miR-224	6,84	9,40	8,52	8,52	2,55	-0,87	0,00	1,68
hsa-miR-26b	7,97	9,91	9,54	9,62	1,94	-0,37	0,08	1,65
hsa-miR-148a	7,35	9,41	8,91	8,95	2,06	-0,50	0,04	1,60
hsa-miR-16	9,47	11,54	11,18	11,06	2,07	-0,36	-0,11	1,59
hsa-miR-29c	9,04	10,66	10,38	10,62	1,61	-0,28	0,24	1,57
hsa-miR-425	6,61	8,21	8,39	8,18	1,59	0,19	-0,21	1,57
hsa-miR-30c	7,80	9,77	9,43	9,31	1,97	-0,34	-0,12	1,51
hsa-let-7g	9,30	11,12	10,59	10,80	1,83	-0,54	0,21	1,50
hsa-miR-151-5p	6,71	8,54	8,17	8,17	1,83	-0,37	0,00	1,46
hsa-miR-200c	10,20	12,01	11,54	11,64	1,82	-0,47	0,09	1,44
hsa-miR-27b	9,26	11,03	10,57	10,62	1,77	-0,47	0,05	1,36
hsa-let-7f	11,11	12,75	12,01	12,19	1,63	-0,73	0,17	1,08
hsa-let-7c	9,10	10,71	10,00	10,15	1,61	-0,71	0,14	1,05

(suite)

Nom	Niveau d'intensité d'expression en log2				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation)			
	D0	D7	FC	WD	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0
hsa-let-7a	11,54	13,16	12,47	12,55	1,62	-0,69	0,08	1,01
hsa-let-7b	11,00	12,66	11,89	11,96	1,67	-0,77	0,07	0,97
hsa-let-7e	8,53	9,91	9,34	9,48	1,38	-0,57	0,15	0,95
hsa-miR-21	14,27	15,83	15,15	15,20	1,56	-0,69	0,06	0,93
hsa-miR-374a	7,04	8,45	7,91	7,83	1,41	-0,54	-0,08	0,79
hsa-miR-125a-5p	7,37	8,66	8,20	8,15	1,29	-0,46	-0,04	0,79
hsa-miR-939	6,64	8,04	7,41	7,34	1,40	-0,63	-0,07	0,70
hsa-miR-106b	8,08	9,47	8,94	8,77	1,39	-0,53	-0,18	0,69
hsa-miR-25	7,15	8,50	7,85	7,80	1,35	-0,65	-0,05	0,66
hsa-miR-96	8,52	9,71	9,21	9,16	1,19	-0,50	-0,04	0,64
hsa-miR-22	10,67	11,75	11,10	11,15	1,09	-0,66	0,05	0,48
hsa-miR-181a	7,05	8,47	7,62	7,25	1,41	-0,84	-0,37	0,20
hsa-miR-21*	7,28	8,49	7,75	7,46	1,21	-0,74	-0,29	0,18
hsa-miR-365	8,44	8,41	7,21	7,25	-0,02	-1,21	0,05	-1,18
hsa-miR-130a	8,83	9,48	7,95	7,52	0,65	-1,53	-0,43	-1,31
hsa-miR-100	8,00	7,55	6,29	6,52	-0,46	-1,25	0,22	-1,49
hsa-miR-193b	8,62	7,95	6,76	6,69	-0,67	-1,19	-0,07	-1,93

[0091] En comparant les miARN que l'on retrouve significativement modulés et exprimés dans au moins une condition de culture cellulaire en séquençage haut-débit de miARN (HTS) ou en puces miARN Agilent®, il est obtenu une forte corrélation entre les résultats obtenus avec les deux techniques, avec un coefficient de corrélation $r=0,9106$ (voir la **Figure 4**).

[0092] En résumé, 26 miARN ont été détectés et sélectionnés en HTS dans au moins une des conditions de culture (avec une abondance d'expression supérieure à 1%) et 48 miARN sur puces miARN Agilent® (avec un niveau d'intensité d'expression en log2 supérieure à 8). Ce qui fait en comptant les miARN communs obtenus par les deux techniques, 61 miARN distincts significativement exprimés dans au moins une des conditions de différenciation de l'épithélium (60 figurent dans le **Tableau VI** auxquels il faut ajouter hsa-miR-1975, voir le **Tableau III**).

[0093] Les 22 miARN identifiés comme significativement régulés et suffisamment abondants en HTS, sont retrouvés aussi modulés sur puces miARN Agilent® avec plus ou moins de significativité et avec des intensités plus ou moins fortes.

[0094] Comme décrit plus haut, les miARN sont synthétisés sous forme de précurseurs ayant une structure en épingle à cheveux puis subissent une dernière maturation par l'enzyme Dicer pour donner deux petits ARN simple brin (5p et 3p) dont un des deux brins dit mature va interagir avec le complexe RISC pour exercer sa fonction modulatrice tandis que l'autre brin complémentaire dit star (annoté mir-xy*) va être dégradé. De ce fait, les Inventeurs ont mesuré systématiquement les deux brins de chacun des miARN à l'aide des différentes techniques utilisées (puces miARN, séquençage, PCR). Les Inventeurs ont pu observer que pour certains des miARN sélectionnés les deux brins (5p et 3p) sont modulés, mais un seul des deux brins pour un miARN sélectionné donné est retrouvé plus abondamment exprimé.

Tableau VI. Comparaison des miARN modulés et exprimés entre puces miARN Agilent® et HTS

Nom	Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation) mesurée avec les puces Agilent				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation) mesurée par séquençage à haut débit				Niveau d'intensité d'expression en log2 mesuré avec les puces Agilent				Niveau d'intensité d'expression en log2 mesuré par séquençage à haut débit			
	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0	D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD
hsa-let-7a	1,62	-0,69	0,08	1,01	-0,64	0,28	0,88	0,51	11,54	13,16	12,47	12,55	3,80	3,16	3,43	4,31
hsa-let-7b	1,67	-0,77	0,07	0,97	-0,57	-0,03	0,66	0,05	11,00	12,66	11,89	11,96	11,23	10,65	10,62	11,28
hsa-let-7c	1,61	-0,71	0,14	1,05	0,14	0,21	0,55	0,90	9,10	10,71	10,00	10,15	6,96	7,10	7,31	7,86
hsa-let-7e	1,38	-0,57	0,15	0,95	0,38	-0,27	0,07	0,18	8,53	9,91	9,34	9,48	7,42	7,80	7,53	7,60
hsa-let-7f	1,63	-0,73	0,17	1,08	0,22	-0,56	0,45	0,11	11,11	12,75	12,01	12,19	5,24	5,46	4,90	5,35
hsa-let-7g	1,83	-0,54	0,21	1,50	-0,24	-0,03	0,83	0,56	9,30	11,12	10,59	10,80	11,84	11,60	11,57	12,40
hsa-miR-100	-0,46	-1,25	0,22	-1,49	-1,05	-2,36	1,69	-1,72	8,00	7,55	6,29	6,52	10,72	9,67	7,32	9,00
hsa-miR-106b	1,39	-0,53	-0,18	0,69	1,33	-0,28	-0,09	0,96	8,08	9,47	8,94	8,77	4,43	5,76	5,48	5,39
hsa-miR-125a-5p	1,29	-0,46	-0,04	0,79	0,64	-0,27	0,79	1,16	7,37	8,66	8,20	8,15	12,92	13,55	13,29	14,08
hsa-miR-130a	0,65	-1,53	-0,43	-1,31	-1,40	0,19	-0,73	-1,94	8,83	9,48	7,95	7,52	13,91	12,51	12,71	11,98
hsa-miR-140-3p	1,54	-0,08	0,06	1,52	0,33	0,37	0,04	0,73	3,55	5,09	5,01	5,07	12,39	12,72	13,08	13,12
hsa-miR-141	2,16	-0,28	0,00	1,88	1,17	0,37	0,17	1,70	11,15	13,31	13,03	13,03	8,05	9,22	9,58	9,75
hsa-miR-148a	2,06	-0,50	0,04	1,60	1,31	-0,28	0,91	1,93	7,35	9,41	8,91	8,95	7,04	8,34	8,06	8,97
hsa-miR-151-5p	1,83	-0,37	0,00	1,46	1,13	-0,02	-0,09	1,02	6,71	8,54	8,17	8,17	9,20	10,33	10,31	10,22
hsa-miR-15a	2,36	-0,39	-0,10	1,87	1,41	-0,19	0,35	1,57	7,74	10,10	9,71	9,61	6,11	7,52	7,33	7,68
hsa-miR-16	2,07	-0,36	-0,11	1,59	2,01	-1,17	1,38	2,22	9,47	11,54	11,18	11,06	3,13	5,14	3,97	5,35
hsa-miR-17	0,31	-1,14	-0,39	-1,22	-0,17	-0,87	-0,20	-1,24	9,03	9,34	8,19	7,81	12,85	12,68	11,81	11,61
hsa-miR-181a	1,41	-0,84	-0,37	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	7,05	8,47	7,62	7,25	0,01	0,01	0,01	0,01
hsa-miR-191	2,32	0,29	-0,30	2,31	0,90	0,84	0,42	2,15	0,64	2,97	3,25	2,95	14,67	15,57	16,40	16,82
hsa-miR-193b	-0,67	-1,19	-0,07	-1,93	-1,17	-0,90	0,48	-1,60	8,62	7,95	6,76	6,69	13,26	12,09	11,19	11,67
hsa-miR-200a	1,94	0,20	0,06	2,20	1,00	0,67	0,54	2,20	8,64	10,58	10,79	10,84	9,02	10,01	10,68	11,22

(suite)

Nom	Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation) mesurée avec les puces Agilent						Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation) mesurée par séquençage à haut débit						Niveau d'intensité d'expression en log2 mesuré avec les puces Agilent						Niveau d'intensité d'expression en log2 mesuré par séquençage à haut débit					
	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0	D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD
hsa-miR-200b	2,01	-0,07	0,17	2,11	0,76	0,56	1,03	2,36	9,93	11,94	11,87	12,04	8,60	9,37	9,93	10,96								
hsa-miR-200c	1,82	-0,47	0,09	1,44	0,78	0,46	1,05	2,29	10,20	12,01	11,54	11,64	8,35	9,13	9,59	10,64								
hsa-miR-203	0,97	-0,67	0,13	0,44	0,11	-0,21	1,18	1,08	10,64	11,61	10,95	11,08	13,50	13,60	13,39	14,57								
hsa-miR-205	1,00	-0,72	-0,39	-0,11	0,62	-1,12	0,44	-0,06	13,18	14,18	13,46	13,07	14,61	15,23	14,11	14,55								
hsa-miR-21	1,56	-0,69	0,06	0,93	-0,74	-1,16	0,74	-1,16	14,27	15,83	15,15	15,20	16,40	15,66	14,50	15,24								
hsa-miR-21*	1,21	-0,74	-0,29	0,18	0,44	-0,62	-0,07	-0,25	7,28	8,49	7,75	7,46	8,34	8,78	8,16	8,09								
hsa-miR-210	0,18	-0,63	-0,11	-0,56	-0,96	-0,74	-0,10	-1,80	9,08	9,25	8,63	8,52	12,29	11,33	10,60	10,49								
hsa-miR-22	1,09	-0,66	0,05	0,48	0,80	-1,14	0,73	0,40	10,67	11,75	11,10	11,15	8,89	9,69	8,55	9,29								
hsa-miR-224	2,55	-0,87	0,00	1,68	1,52	-0,72	0,83	1,63	6,84	9,40	8,52	8,52	9,59	11,12	10,39	11,22								
hsa-miR-23a	0,78	-0,94	0,02	-0,14	0,06	-0,80	0,43	-0,31	11,72	12,50	11,56	11,58	14,42	14,47	13,67	14,10								
hsa-miR-23b	1,96	-0,27	0,04	1,72	1,30	-0,17	0,16	1,29	8,92	10,88	10,61	10,64	14,06	15,35	15,18	15,35								
hsa-miR-25	1,35	-0,65	-0,05	0,66	0,66	-0,03	-0,39	0,24	7,15	8,50	7,85	7,80	9,11	9,77	9,74	9,35								
hsa-miR-26a	2,20	-0,11	0,06	2,15	1,31	-0,98	2,90	3,22	8,50	10,70	10,59	10,65	0,30	1,61	0,62	3,52								
hsa-miR-26b	1,94	-0,37	0,08	1,65	0,09	0,05	0,78	0,92	7,97	9,91	9,54	9,62	6,84	6,93	6,97	7,75								
hsa-miR-27b	1,77	-0,47	0,05	1,36	0,64	-0,69	-0,06	-0,11	9,26	11,03	10,57	10,62	6,92	7,57	6,88	6,81								
hsa-miR-29a	0,17	-0,71	0,16	-0,38	-1,34	-0,11	0,02	-1,43	11,23	11,40	10,69	10,85	16,24	14,90	14,79	14,81								
hsa-miR-29c	1,61	-0,28	0,24	1,57	0,82	0,02	0,03	0,87	9,04	10,66	10,38	10,62	13,66	14,48	14,50	14,53								
hsa-miR-30b	2,36	0,05	0,15	2,55	0,83	-0,27	0,68	1,24	7,62	9,98	10,03	10,17	8,50	9,33	9,06	9,74								
hsa-miR-30c	1,97	-0,34	-0,12	1,51	0,32	-0,33	-0,39	-0,40	7,80	9,77	9,43	9,31	0,42	0,73	0,41	0,01								
hsa-miR-30d	1,88	-0,06	0,05	1,86	0,64	-0,09	1,20	1,75	7,06	8,94	8,88	8,92	9,12	9,76	9,67	10,87								
hsa-miR-30e	2,76	-0,25	-0,13	2,38	1,27	-0,02	0,46	1,71	6,73	9,50	9,25	9,12	7,04	8,31	8,30	8,76								
hsa-miR-31	0,77	-1,16	-0,15	-0,54	-0,37	-0,91	0,34	-0,95	10,13	10,90	9,74	9,59	13,69	13,31	12,40	12,74								

(suite)

Nom	Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation) mesurée avec les puces Agilent				Modulation (ratio du niveau d'intensité d'expression en log2 à deux stades de différenciation) mesurée par séquençage à haut débit				Niveau d'intensité d'expression en log2 mesuré avec les puces Agilent				Niveau d'intensité d'expression en log2 mesuré par séquençage à haut débit			
	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0	D7-D0	FC-D7	WD-FC	WD-D0	D0	D7	FC	WD	D0	D7	FC	WD
hsa-miR-31*	0,43	-1,10	-0,10	-0,77	-0,65	-1,31	0,24	-1,73	9,00	9,42	8,33	8,22	13,56	12,91	11,60	11,83
hsa-miR-34a	2,31	-0,54	0,13	1,91	1,46	-1,04	0,45	0,88	8,58	10,89	10,35	10,49	10,31	11,77	10,73	11,18
hsa-miR-34b	2,88	4,48	0,81	8,17	1,25	4,17	1,32	6,74	0,77	3,65	8,13	8,94	7,01	8,26	12,43	13,75
hsa-miR-34b*	2,02	3,36	1,10	6,48	1,22	3,50	0,95	5,67	5,96	7,98	11,35	12,44	4,99	6,20	9,70	10,65
hsa-miR-34c-5p	2,35	4,27	0,82	7,44	1,33	4,02	1,06	6,41	3,94	6,29	10,56	11,39	7,88	9,21	13,23	14,29
hsa-miR-365	-0,02	-1,21	0,05	-1,18	-0,39	0,00	0,00	-0,39	8,44	8,41	7,21	7,25	0,41	0,01	0,01	0,01
hsa-miR-374a	1,41	-0,54	-0,08	0,79	-0,33	1,74	0,74	2,16	7,04	8,45	7,91	7,83	0,62	0,30	2,04	2,78
hsa-miR-378	3,23	-0,81	-0,26	2,16	2,15	-0,26	-0,39	1,50	4,38	7,61	6,80	6,54	10,37	12,53	12,26	11,87
hsa-miR-425	1,59	0,19	-0,21	1,57	0,42	0,74	-0,04	1,12	6,61	8,21	8,39	8,18	10,58	11,01	11,75	11,70
hsa-miR-429	1,71	0,14	0,10	1,95	0,42	0,14	0,74	1,30	7,97	9,68	9,82	9,93	8,23	8,65	8,79	9,53
hsa-miR-449a	6,53	5,70	-0,15	12,08	5,21	5,21	0,21	10,63	1,47	8,00	13,70	13,54	4,48	9,69	14,90	15,11
hsa-miR-449b	2,61	6,25	-0,22	8,64	3,32	5,40	-0,12	8,60	0,47	3,08	9,33	9,11	3,64	6,96	12,36	12,24
hsa-miR-574-3p	1,69	-0,46	-0,18	1,04	0,48	0,12	0,32	0,92	4,73	6,42	5,96	5,77	13,64	14,12	14,24	14,56
hsa-miR-92b	0,48	4,21	-0,29	4,39	1,21	4,12	0,60	5,93	0,10	0,57	4,78	4,49	7,49	8,70	12,82	13,42
hsa-miR-939	1,40	-0,63	-0,07	0,70	0,13	-0,13	0,00	0,00	6,64	8,04	7,41	7,34	0,01	0,15	0,01	0,01
hsa-miR-96	1,19	-0,50	-0,04	0,64	-0,08	-0,71	0,81	0,02	8,52	9,71	9,21	9,16	5,41	5,33	4,62	5,43
hsa-miR-99a	2,33	0,77	0,19	3,28	1,43	0,77	0,69	2,88	5,02	7,35	8,12	8,31	9,77	11,19	11,96	12,65

[0095] . On peut noter que mir-449a, mir-449b, mir-449b*, mir-34a, mir-34b (3p), mir-34b* (5p), mir-34c (5p) sont retrouvés significativement modulés au cours de la différenciation et donc impliqués dans l'initiation et le maintien de l'état de différenciation de l'épithélium respiratoire.

[0096] Ces cinq miARN : mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b, mir-34c sont retrouvés fortement induits au cours de la différenciation, plus particulièrement au début de la ciliogénèse. Une fois induite, leur expression demeure élevée et stable tout au long de la différenciation y compris dans l'épithélium pleinement différencié. Le répertoire des miARN de l'épithélium complètement différencié se caractérise par une abondance remarquable de ces 5 miARN qui représentent près de 20% du nombre total de tous les miARN exprimés dans ce tissu. Concernant mir-34a, son induction est néanmoins moins forte que les quatre autres miARN et est retrouvée de manière plus précoce au stade ALI-D7.

[0097] De manière intéressante, les brins 5p de chacun des miARN mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b et mir-34c partagent une homologie de séquence au niveau de leur séquence de reconnaissance suggérant qu'ils ciblent en commun certains transcrits.

[0098] C'est pourquoi les Inventeurs ont ensuite concentré leurs efforts sur ces 5 miARN. Les niveaux de régulations de ces miARN ainsi que de mir-31 (qui est retrouvé réprimé au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire) ont été validés par une troisième approche par PCR quantitative (voir la **Figure 5**).

[0099] Ces 5 miARN surexprimés au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire appartiennent à deux familles de miARN distinctes : mir-449 et mir-34. Par ailleurs, la localisation génomique de mir-449a et de mir-449b est identique : tous deux sont localisés au niveau du deuxième intron du gène cdc20b, situé sur le chromosome 5 humain (5q11.2, chr5:54456388-54504760). La famille mir-34 est composée de mir-34a qui est localisé dans une région intergénique du chromosome 1 alors que les miARN mir-34b et mir-34c appartiennent au même cluster et sont localisés tous deux dans une région intergénique du chromosome 11. La famille mir-34 a été fonctionnellement reliée à la voie de signalisation p53.

II-2.B. Cellules épidermiques ciliées d'embryons de Xenope

[0100] Les résultats obtenus pour ce modèle sont présentés dans le Tableau IIIB ci-après et à la **Figure 6** qui présente également des résultats pour les cellules HAEC.

[0101] Ces essais montrent que, là encore, la famille de microARN miR-449, et plus particulièrement le miR-449a, constituent de loin les microARN les plus fortement induits au cours ciliogénèse.

Tableau IIIB - miARN significativement exprimés dans les cellules ciliées de l'épiderme d'embryon de xénope, comparaison avec des cellules non ciliées

xenopus miRNA	LogRatio d'expression des miR entre cilié-non cilié	% de miR cellules non ciliées	% de miR cellules ciliées	sd non-cilié	sd cilié
miR-449a	3,166507029	4,241910975	38,99145137	0,66831542	0,5580561
miR-17-5p	1,843961214	1,739241798	6,439037664	0,03088444	0,44692614
miR-427	-3,577711451	84,3912305	7,287645762	3,81200367	0,43536764
miR-18a	1,963297831	1,445998485	5,770842336	0,25353698	0,40662557
miR-203	2,899525765	0,802824596	6,122022692	0,14427702	0,16748381
miR-429	3,489311848	0,5611861	6,308452174	0,18811487	0,19190601
miR-34b	8,639233391	0,023309799	6,678155706	0,02362849	0,24212636
miR-130c	3,303007088	0,319262952	3,090857721	0,13938414	0,20761583
miR-20b	0,920427989	1,297427834	1,839130412	1,29177087	0,55721948
miR-200a	2,92597595	0,309242272	2,418052837	0,03713634	0,23727106
miR-130b	5,041603605	0,061086987	2,057820515	0,01136075	0,16380899
miR-106	2,067406718	0,395322902	1,683867839	0,09703348	0,14099092
miR-93b	0,31478571	0,797852579	0,902730776	0,63514139	0,4494722
miR-93a	0,317106219	0,795629375	0,898232543	0,63828547	0,44663817
miR-26	2,754387045	0,166267205	1,158759618	0,02096265	0,18818027

(suite)

xenopus miRNA	LogRatio d'expression des miR entre cilié-non cilié	% de miR cellules non ciliées	% de miR cellules ciliées	sd non-cilié	sd cilié
miR-20a	2,428912948	0,212684269	1,096366145	0,11342212	0,12723715
miR-218	12,28452357	0,002273204	1,086641349	0,00307337	0,11041905
miR-34a	1,883909316	0,183851237	0,690835543	0,04597169	0,08895895

II-2.C. Discussions

[0102] Alors que les miR-449 représentent moins de 0,01% de toutes les séquences de microARN dans les cellules HAECs au cours de leur multiplication, ces miR-449 représentent plus de 8% des microARN exprimés dans les cellules HAECs différenciées (voir la **Figure 6** graphes a et b). De même, le miR-449a dans les cellules de *Xenope* augmente significativement au cours de la différenciation, représentant jusqu'à 39% de toutes les séquences de microARN dans ciliées d'explants épidermique (voir la **Figure 6**, graphes c-d).

[0103] Comme indiqué plus haut, les miR-449 et les miR-34 appartiennent à une même superfamille de microARN. De façon intéressante, on note que l'expression des membres de la famille miR-34 a été également induite au cours de la ciliogenèse dans les deux modèles (voir la **Figure 6**, graphes a et b), même si elle l'est dans une moindre mesure que celle des miR-449.

[0104] La famille des miR-449 semble être conservée chez les vertébrés : l'étude des loci synténiques de *Cdc20b* (où est localisé le cluster miR-449 chez l'homme et chez la grenouille) a révélé l'existence de miR-449 dans tous les génomes de vertébrés totalement ou partiellement séquencés.

[0105] Les cellules HAECs différenciées et les cellules ciliées de l'épiderme de *Xenopus laevis* sont constitués d'un mélange de différents types cellulaires, incluant des cellules basales, des cellules muco-sécrétrices et des cellules multiciliées.

[0106] L'hybridation *in situ* sur les cultures primaires HAEC (voir les clichés a et c de la **Figure 7**) et sur le tissu bronchique de l'homme (voir les clichés e et g de la **Figure 7**) a révélé que les miR-449 ont été exprimées dans les cellules cylindriques multiciliées mais pas dans les cellules basales (voir le cliché a de la **Figure 7**) ou dans les cellules sécrétrices muc5AC-positives (voir le cliché e de la **Figure 7**).

[0107] Ces résultats ont été confirmés par les essais de séquençage haut débit sur des fractions enrichies en cellules cylindriques (principalement composées de cellules multiciliées et de quelques cellules muco-sécrétrices) et en cellules basales, dérivées de l'épithélium des voies respiratoires de l'homme.

[0108] Le graphe d de la **Figure 7** montre un enrichissement des miR-449 dans la fraction de cellules ciliées, tandis que l'expression des miR-34 observée est plus uniforme et a été observée dans les deux types de cellules.

[0109] Enfin, l'hybridation *in situ* sur les cellules d'embryons de *Xenope* a révélé que l'expression des miR-449 a été restreinte aux cellules ciliées, cellules qui sont positives au marquage à la tubuline acétylée (voir les clichés h et i de la **Figure 7**).

[0110] L'ensemble de ces résultats montrent que les miR-449 sont les microARN les plus abondants des cellules multiciliées de vertébrés.

III- Détermination des cibles spécifiques des miARN sélectionnés

III-1. Identification du type cellulaire spécifique de chaque miARN

[0111] Comme l'épithélium respiratoire natif, le modèle de différenciation *in vitro* utilisé dans ces essais est constitué de cellules basales, de cellules ciliées et de cellules sécrétrices de mucus. En vue d'identifier les répertoires des miARN spécifiques à chacun des types cellulaires, les Inventeurs ont utilisé le tri cellulaire par cytométrie de flux à l'aide de marqueurs spécifiques (Hajj, R. *et al.* 2007). A l'aide de cette technique, des cellules respiratoires adultes progénitrices (correspondant *a priori* à des cellules basales) ont été isolées, sélectionnées et triées (de telles cellules apparaissent doublement positives pour la tétraspanine CD151 et pour le facteur tissulaire) des cellules pyramidales (i.e. les cellules ciliées et les cellules sécrétrices de mucus) qui apparaissent négatives pour ces mêmes marqueurs. Ces purifications ont été réalisées à partir de polypes ou de cornets nasaux issus de 3 donneurs distincts.

[0112] Après avoir extrait les ARN totaux, les profils d'expression des miARN ont été établis à l'aide de puces commerciales Agilent® ou par séquençage à haut-débit (HTS). Les deux approches expérimentales corroborent pour plusieurs miARN sélectionnés dont mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b, mir-34b* (mir-34b-5p), mir-34c et mir-34c* (mir-

34c-3p) leur expression spécifique dans les cellules épithéliales ciliées. De plus, cette expérience de tri cellulaire permet de montrer que les miARN réprimés dans les cellules en culture (e.g. mir-31, mir-31*, mir-205, mir-130a, mir-193b) sont plus spécifiques des cellules basales (voir la **Figure 8** et le **Tableau VII**). Pour la première fois, les Inventeurs attribuent ainsi de manière spécifique un répertoire d'expression des miARN à des types cellulaires distincts de l'épithélium respiratoire au cours de la différenciation.

Tableau VII. miARN spécifiques des cellules basales ou des cellules pyramidales (ciliées+sécrétrices) identifiés par HTS et puces Agilent®.

Nom	Modulation de l'expression des miARN dans les cellules pyramidales (323(-)) par rapport aux cellules basales 323(+)	Intensité du niveau d'expression en log2 dans des cellules basales (323(+))	Intensité du niveau d'expression en log2 dans des cellules pyramidales (323(-))
hsa-let-7a	-1,29	11,93	10,65
hsa-let-7b	-1,96	12,20	10,24
hsa-let-7c	-0,48	9,43	8,95
hsa-let-7e	-1,42	8,24	6,82
hsa-let-7f	-0,94	10,82	9,88
hsa-let-7q	-0,15	8,37	8,22
hsa-miR-100	1,62	3,28	4,90
hsa-miR-106b	-2,05	7,22	5,16
hsa-miR-125a-5p	-0,05	6,63	6,58
hsa-miR-130a	-6,33	9,76	3,43
hsa-miR-140-3p	0,91	2,75	3,66
hsa-miR-141	-2,88	11,12	8,24
hsa-miR-148a	-1,76	7,14	5,39
hsa-miR-151-5p	-0,73	7,24	6,51
hsa-miR-15a	-2,10	7,86	5,75
hsa-miR-16	-0,48	9,10	8,62
hsa-miR-17	-2,60	6,64	4,04
hsa-miR-181a	-2,29	6,88	4,59
hsa-miR-191	0,00	0,14	0,14
hsa-miR-193b	-3,57	3,90	0,33
hsa-miR-200a	-0,95	8,80	7,85
hsa-miR-200b	-0,15	9,99	9,84
hsa-miR-200c	-0,67	10,24	9,57
hsa-miR-203	-3,50	3,64	0,14
hsa-miR-205	-7,00	12,44	5,44
hsa-miR-21	-1,26	11,34	10,08
hsa-miR-21*	-2,20	5,03	2,83
hsa-miR-210	-2,03	6,60	4,57
hsa-miR-22	-1,73	8,81	7,07

EP 2 459 232 B1

(suite)

5	Nom	Modulation de l'expression des miARN dans les cellules pyramidales (323(-)) par rapport aux cellules basales 323(+)	Intensité du niveau d'expression en log2 dans des cellules basales (323(+))	Intensité du niveau d'expression en log2 dans des cellules pyramidales (323(-))
	hsa-miR-224	-2,84	3,65	0,82
	hsa-miR-23a	-2,45	10,25	7,80
10	hsa-miR-23b	-2,23	9,41	7,18
	hsa-miR-25	-0,70	5,40	4,70
	hsa-miR-26a	-2,24	9,92	7,68
15	hsa-miR-26b	-1,47	8,75	7,28
	hsa-miR-27b	-3,56	9,77	6,21
	hsa-miR-29a	-2,95	11,09	8,14
	hsa-miR-29c	-3,06	11,06	8,00
20	hsa-miR-30b	-0,80	8,76	7,96
	hsa-miR-30c	-1,01	6,92	5,91
	hsa-miR-30d	-1,11	8,16	7,05
25	hsa-miR-30e	-1,60	6,94	5,34
	hsa-miR-31	-4,31	6,36	2,05
	hsa-miR-31*	-3,70	3,84	0,14
	hsa-miR-34a	0,64	6,72	7,36
30	hsa-miR-34b	8,24	0,88	9,12
	hsa-miR-34b*	6,05	5,48	11,52
	hsa-miR-34c-5p	5,74	4,75	10,49
35	hsa-miR-365	-0,99	4,83	3,84
	hsa-miR-374a	-1,04	4,26	3,22
	hsa-miR-378	-2,43	4,11	1,68
40	hsa-miR-425	0,70	4,52	5,22
	hsa-miR-429	-0,31	6,92	6,61
	hsa-miR-449a	6,07	2,81	8,88
45	hsa-miR-449b	4,05	0,14	4,18
	hsa-miR-574-3p	0,91	3,53	4,44
	hsa-miR-768-3p	-1,20	10,15	8,95
50	hsa-miR-92b	1,67	0,40	2,07
	hsa-miR-939	1,28	4,81	6,08
	hsa-miR-96	-1,51	6,81	5,30
55	hsa-miR-99a	0,99	5,42	6,40

III-2. Identification des ARNm cibles des miRNA sélectionnés

[0113] Un enjeu majeur dans la biologie des miARN est de pouvoir identifier et caractériser expérimentalement les ARNm cibles qu'ils régulent. Dans cette perspective, ont été combinées des approches *in silico* (logiciels bioinformatiques prédictifs de cibles), des approches expérimentales (puces transcriptomes, expression ectopique de miARN ainsi que de vecteurs rapporteur contenant la partie 3'-UTR du gène d'intérêt fusionné à la luciférase). Des expériences complémentaires ont utilisé des approches d'immunocytochimie, de vidéo-microscopie et de biochimie.

[0114] Plusieurs algorithmes de prédiction de cibles ont été proposés. Ils sont basés généralement sur : i) la complémentarité entre le miARN et le 3'UTR de l'ARNm cible au niveau de la région 5' du miARN (séquence de reconnaissance) ; ii) la conservation phylogénétique de cette séquence dans le 3'UTR de l'ARNm cible.

[0115] Afin de déterminer les gènes cibles potentiellement régulés par ces miARN d'intérêt, les Inventeurs ont procédé à l'établissement d'un profilage des ARNm par puce d'expression (Affymetrix, human HuGene 1.0 ST microarrays). Les échantillons analysés sont les mêmes que ceux qui ont servi pour la mesure des miARN au cours de la différenciation. Une approche complémentaire a consisté à évaluer le transcriptome de cellules épithéliales respiratoires après manipulation du niveau d'expression des miARN sélectionnés par transfection. Une sélection de gènes-cibles en relation avec la régénération et la différenciation de l'épithélium a été réalisée à l'aide de supports bioinformatiques (Mediante, Ingenuity Pathway™). Les Inventeurs ont ainsi pu établir un lien fonctionnel entre les miARN précédemment identifiés et un certain nombre de transcrits impliqués dans la régénération et la différenciation de l'épithélium respiratoire humain. Les résultats obtenus montrent que 500-1000 transcrits sont associés à la différenciation (voir la **Figure 9**).

[0116] Seule l'expression de quelques gènes varie entre ALI-FC and ALI-WD, indiquant une stabilité de l'expression des ARN une fois la ciliogénèse enclenchée.

III-3. Identification *in silico* des gènes cibles putatifs communs des brins 5p des miARN mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b et mir-34c

[0117] Les gènes cibles prédits ont été récupérés pour chacun des brins 5p des 5 miARN sélectionnés mir-449a, mir-449b et mir-34a, mir-34b-5p (mir-34b*) et mir-34c-5p qui partagent une homologie de séquence au niveau de leur séquence de reconnaissance, à l'aide d'outils bioinformatiques prédictifs (*i.e.* TargetScan, mirbase target, picTar and Microcible 2to8) accessibles à travers l'interface réseau Mediante (www.microarray.fr). Les Inventeurs ont tout d'abord sélectionné les gènes cibles prédits communs aux 5 miARN d'intérêts, qui ont été validés à l'aide de la méthodologie détaillée ci-dessus. Sur près de 3500 cibles prédites pour chacun des miARN pris séparément, 1229 cibles sont communes aux 5 miARN sélectionnés. Les 1229 cibles prédites ont ensuite été comparées avec celles significativement réprimées (environ 1000, $P < 0.05$) au cours de la différenciation plus particulièrement entre la condition pleinement différenciée et la première étape de prolifération non-différenciée (ALI-WD versus ALI-D0 ($n=3$ donneurs)). Ainsi, les résultats montrent 62 gènes communs aux 5 miARN sélectionnés susceptibles de jouer un rôle clé dans la régénération de l'épithélium respiratoire (voir le **Tableau VIII**). Parmi ces gènes, est retrouvée notamment la cavéoline-1. Les résultats montrent que la cavéoline-1 est fortement inhibée tout au long de la différenciation (voir la **Figure 8**).

Tableau VIII. Listes des gènes cibles putatifs des microARN sélectionnés retrouvés inhibés au cours de la différenciation de l'épithélium respiratoire.

Gène	Modulation de l'expression des gènes entre les stades de différenciation WD et D0-ALI	Amean (sur 3 donneurs)	Adjust.P.Value	Numéro d'accèsion du gène
ABLM3	-1.4481743	7.524965	3.82E-04	NM_014945
ADAM 19	-1.1163435	6.14820233	5.45E-07	NM_033274
ADAMTSL4	-1.1186815	7.2720022	4.62E-04	NM_019032
ADCY7	-1.382631	7.6534838	2.38E-07	NM_001114
AMOTL1	-1.7460034	8.6474232	2.94E-06	NM_130847
ARPP-19	-1.0941527	8.8116738	1.22E-05	NM_006628
BMP1	-0,9680967	8,6574928	1.38E-05	NM_001199
BTBD11	-1.8490199	7.6618604	1.14E-05	NM_001018072
C12orf29	-1.2553972	8.48381407	1.68E-04	NM_001009894
CAV1	-2.368023	9.93025267	4.53E-06	NM_001753

EP 2 459 232 B1

(suite)

5	Gène	Modulation de l'expression des gène entre les stades de différenciation WD et D0-ALI	Amean (sur 3 donneurs)	Adjust.P.Value	Numéro d'accension du gène
	CDA	-2.481947	6.80947653	2.94E-07	NM_001785
	CDC25A	-1.3080745	6.28751913	4.79E-06	NM_001789
10	CDCA5	-1.0540303	6.48987507	1.09E-04	NM_080668
	COL7A1	-1.6867157	8.59302327	1.04E-06	NM_000094
	CPM	-1.4438189	8.6954668	9.13E-03	NM_001005502
	CRABP2	-1.4293157	9.39830873	6.87E-05	NM_001878
15	CTNNBIP1	-1.0108869	9.35766273	2.86E-08	NM_020248
	DKK1	-2.5935028	7.03329227	4.98E-04	NM_012242
	DLL1	0,2733639	7,4865392		NM_005618
20	DSC3	-1.3986191	9.60600093	5.07E-03	NM_024423
	EFNA3	-1.0526506	7.54088253	1.52E-03	NM_004952
	EFNB1	-1.6142037	8.63543853	1.49E-05	NM_004429
	EMP1	-3.521182	8.67082233	5.65E-04	NM_001423
25	FSTL3	-1.617425	8.44148553	2.91 E-06	NM_005860
	FUT11	-1.0545791	8.3877732	3.81 E-04	NM_173540
	GLTP	-1.197381	10.2894117	5.63E-04	NM_016433
30	GPX3	-1.483986	8.54605007	1.59E-04	NM_002084
	IL1RN	-2.7062559	9.60439793	2.04E-05	NM_173841
	IQGAP3	-1.1769401	6.3339546	1.56E-03	NM_178229
	IRAK2	-1.1324037	7.05078867	1.95E-04	NM_001570
35	ITPR2	-1.1585075	6.7519412	9.93E-05	NM_002223
	JAG1	-0,8238893	10,024193		NM_00214
	KDEL3	-1.604097	6.37016313	1.74E-07	NM_006855
40	LYPD3	-1.9136232	9.53049673	1.19E-03	NM_014400
	MAP4K4	-1.3458818	9.26761513	5.77E-07	NM_145686
	MYO5A	-1.5881695	7.809912	3.04E-10	NM_000259
	NDRG1	-1.3955203	11.7800207	4.34E-03	NM_006096
45	NEDD4	-1.8082366	7.2788706	7.67E-04	NM_006154
	NOTCH1	-0,5783195	8,7229346	0,0256397	NM_017617
	PDLIM7	-1.3596731	8.12085653	4.91 E-06	NM_005451
50	PEA15	-1.1301513	9.77535027	1.27E-03	NM_003768
	PGAM4	-1.1640039	10.9063747	6.86E-08	NM_001029891
	PNPLA3	-1.3599861	6.92883227	4.50E-06	NM_025225
	PPL	-1.1742775	10.6121583	1.74E-03	NM_002705
55	PRELID2	-1.2843971	6.360054	2.69E-08	NM_182960
	PRKCA	-1.1283394	6.67201333	2.48E-04	NM_002737

(suite)

Gène	Modulation de l'expression des gène entre les stades de différenciation WD et D0-ALI	Amean (sur 3 donneurs)	Adjust.P.Value	Numéro d'accension du gène
RAET1 L	-2.9534389	8.77895953	1.67E-06	NM_130900
RIN1	-1.23138	7.72833807	2.35E-06	NM_004292
SC5DL	-1.1485737	9.615791	3.44E-06	NM_006918
SEMA4B	-1.1518643	9.4275898	3.23E-05	NM_198925
SERPINB2	-1.398391	11.0805848	8.01 E-05	NM_002575
SERPINE1	-2.945564	9.083679	1.16E-02	NM_000602
SLC37A2	-1.5591718	7.97890727	2.68E-06	NM_198277
SLC4A7	-1.5922747	8.1975794	8.73E-10	NM_003615
SPARC	-2.1890128	6.9962164	3.28E-06	NM_003118
SYNC1	-1.1653204	6.9710348	5.37E-05	NM_030786
TGFA	-2.1820264	8.82130713	1.10E-07	NM_003236
TGFB1	-1.3975298	9.96521733	1.62E-03	NM_000358
TGM2	-2.4139445	8.10195833	7.22E-08	NM_004613
TMBIM1	-1.2519402	11.9735373	2.56E-04	NM_022152
TMCC3	-1.117217	7.91308893	1.99E-06	NM_020698
TMEFF1	-1.3004997	6.23670373	3.30E-04	NM_003692
TNS4	-1.1104828	9.96975587	3.06E-06	NM_032865
UHRF2	-1.1846124	8.1264516	1.95E-05	NM_152896
VAT1	-1.2608379	9.68055807	6.22E-07	NM_006373
VSIG1	-1.3975763	4.822476	6.93E-10	NM_182607
WNT4A	0,9209719	8,8476432	0,0017319	NM_030761
WNT7A	-2,0382706	8,0121046	1,19E-08	NM_004625

[0118] A cette liste de gènes cibles d'intérêt, peuvent être ajoutés les gènes Rfx2, Rfx3, FoxJ1 et STATH qui sont les cibles prédites par bioinformatique de miR-31 et/ou miR-130a.

IV- Validation de la Cavéoline-1 comme cible des miARN sélectionnés

[0119] La cavéoline-1 (Cav-1) est une protéine membranaire de 22-kDa essentielle à la formation de petites invaginations de la membrane plasmique appelées caveolae. Le gène Cav-1 est exprimé dans les cellules adhérentes (endothéliales, épithéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses).

[0120] Plus particulièrement, il a été montré que les cavéolines sont présentes à la surface membranaire des cellules épithéliales basales et ciliées, indiquant un rôle crucial dans ces types cellulaires (Krasteva, G. et al. (2006) Respir Res 7, 108). Une perte d'expression de cavéoline-1 peut conduire à une prolifération et une différenciation épithéliales défectueuses (Yang, G. et al. (2008) Exp Mol Pathol 84, 131-140).

[0121] En outre, les cavéolines ont été incriminées dans diverses susceptibilités aux pathologies respiratoires. Par exemple, les *caveolae* contiennent une variété de récepteurs, et la Cav-1 a été impliquée dans la réduction du nombre de récepteurs du transforming growth factor (TGF)-beta présents à la surface cellulaire. Des travaux antérieurs ont souligné la contribution probable d'un défaut de cavéoline-1 dans plusieurs pathologies respiratoires en conséquence d'une perturbation de la voie du TGF-beta Le Saux, C.J. et al. (2008) J Biol Chem 283, 5760-5768).

[0122] Par ailleurs, il a été montré que plusieurs micro-organismes utilisaient sélectivement les *caveolae* pour infecter les cellules (Norkin, L.C. et al. (2001) Exp Cell Res 266, 229-238). Comme ces *caveolae* sont localisés sur la surface basolatérale des cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, ils pourraient notamment être impliqués dans l'endocytose

d'agents infectieux lors d'une lésion épithéliale (Krasteva, G. *et al.*, 2006). En effet, les adénovirus nécessitent une perte d'intégrité de l'épithélium ou des jonctions serrées pour accéder à la membrane basolatérale des cellules ciliées pour exercer leur pouvoir pathogène (Walters, R.W. *et al.* (1999) J Biol Chem 274, 10219-10226). Enfin, les cellules basales seraient plus vulnérables aux infections (Pickles, R.J. *et al.* (1996) Hum Gene Ther 7, 921-931 (1996). En accord avec cela, il a été montré que le nombre des *caveolae* est plus important au niveau des cellules basales que des cellules ciliées (Krasteva, G. *et al.*, 2006).

IV-1. Principe des essais

[0123] L'algorithme MicroCible a été utilisé ; il identifie 7 sites de fixation différents pour miR-34b-5p dans le transcrit de Cav-1, contre 3 sites de fixation différents pour mir-34a/34c-5p, mir-449a/b. Les Inventeurs ont construit un vecteur d'expression d'un gène rapporteur dans lequel la partie 3'-UTR entière de la Cav-1 a été insérée en aval de la séquence codante de la luciférase. Ensuite, les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec ce vecteur et chacun des 5 miARN sélectionnés (mir34a/b-5p/c-5p/449a/b), indépendamment en comparaison avec un miARN contrôle négatif.

IV-2. Matériels et méthodes

Vecteurs d'expression 3'-UTR et mesure d'activité luciférase.

[0124] La séquence complète de la partie non codante (3'-UTR) de la cavéoline (SEQ ID N°178) est amplifiée par PCR puis clonée au niveau des sites XhoI and NotI du vecteur psiCheck2 (Promega).

[0125] Les microARN synthétiques d'intérêts (miR-34a, miR-34b*, miR-34c-5p et le miR contrôle négatif (miR-Neg1)) ont été synthétisés par la société Ambion (Applied Biosystems). Une transfection inverse a été réalisée sur les cellules HEK293T (20000 cellules par puits) dans une plaque 96-puits blanche avec 100ng de vecteur plasmidique psiCheck2 et 5 nmoles de miARN synthétique en utilisant comme agent de transfection la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 48 heures après la transfection, les activités des luciférases renilla et firefly ont été évaluées avec le kit Dual Glo Luciferase Assay System (Promega) et mesurées à l'aide d'un luminomètre (Luminoskan Ascent, Thermolab system).

Identification de voies de signalisation

[0126] Le software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Mountain View, USA) a été utilisé pour identifier des réseaux d'interaction entre gènes d'intérêts et d'autres groupes fonctionnels. Les gènes ayant un ratio supérieur à 1 ont été sélectionnés. Ainsi, il est possible d'associer des fonctions biologiques et des maladies à nos résultats expérimentaux.

IV-3. Résultats

[0127] Les Inventeurs ont montré que mir-34b-5p inhibait significativement ($P < 0.01$) l'expression du gène de la luciférase lorsque celle-ci est fusionnée à la partie 3' non-codante de la cavéoline-1. Ces résultats additionnés au fait que les inventeurs retrouvent la cavéoline-1 fortement inhibée au cours de la différenciation indiquent que la Cav-1 est une cible spécifique de mir-34b* (mir-34b-5p) impliquée dans le processus de différenciation de l'épithélium respiratoire (**Figure 11**).

[0128] Il apparait vraisemblable que les miARN, mir-449a, mir-449b, mir-34a et mir-34b*, ne réprimant pas la cavéoline-1, agissent sur la régulation d'un ou plusieurs autres gènes.

[0129] Selon le même principe, l'essai réalisé avec la cavéoline a été reproduit avec d'autres gènes cibles d'intérêt ; la séquence 3'-UTR des gènes suivants a été clonée AREG (SEQ ID N°179), AURKA (SEQ ID N°180), CAPN13 (SEQ ID N°181), CCNB1 (SEQ ID N°182), CCNE2 (SEQ ID N°183), CDC6 (SEQ ID N°184), CDC25A (SEQ ID N°185), CENPK (SEQ ID N°186), CEP55 (SEQ ID N°187), CDC20B (SEQ ID N°188), E2F7 (SEQ ID N°189), FOXM1 (SEQ ID N°190), STATH (SEQ ID N°191) et TOP2A (SEQ ID N°192).

Tableau IX - liste des gènes cibles validé par au moins un des miARN sélectionné

Cibles de miR-449a/b ou miR-34a,b,b*,c-3p,c-5p testées expérimentalement	Description du gène	Numéro d'accèsion du gène	cibles validées pour au moins un des miARN
AREG (SEQ ID N°179)	Homo sapiens amphiregulin (AREG), mRNA.	NM_001657	miR-449a/b et miR-34a/c-5p

(suite)

Cibles de miR-449a/b ou miR-34a,b,b*,c-3p,c-5p testées expérimentalement	Description du gène	Numéro d'accèsion du gène	cibles validées pour au moins un des miARN
AURKA (SEQ ID N°180)	Homo sapiens aurora kinase A (AURKA), transcript variant 1, mRNA.	NM_198433	miR-34b
CCNB1 (SEQ ID N°182)	Homo sapiens cyclin B1 (CCNB1), mRNA.	NM_031966	miR-449a/b et miR-34a/c-5p
CCNE2 (SEQ ID N°183)	Homo sapiens cyclin E2 (CCNE2), mRNA.	NM_057749	miR-449a/b et miR-34a/c-5p
CDC25A (SEQ ID N°185)	Homo sapiens cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) (CDC25A), transcript variant 1, mRNA.	NM_001789	miR-449a/b et miR-34a/c-5p
CEP55 (SEQ ID N°187)	Homo sapiens centrosomal protein 55kDa (CEP55), transcript variant 1, mRNA.	NM_018131	miR-34b*

[0130] Une cible est validée dès lors que son expression est inhibée par un miARN.

V- Identification par puces ADN (Affymetrix®) des cibles des miARN d'intérêts : mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b*, mir-34c-5p

[0131] Afin de déterminer les gènes modulés spécifiquement par l'expression d'un miARN d'intérêt, chaque miARN, mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b* et mir-34c-5p, est transfecté dans des cultures primaires de cellules épithéliales respiratoires non-différenciées (HAECs) et étudié par puces transcriptome (Affymetrix®), 48h après la transfection, les gènes différenciellement modulés.

[0132] Etant donné que mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b*, mir-34c-5p partagent le même « seed » (séquence 2-7), ils sont susceptibles d'interagir avec des cibles communes. De ce fait, 95 gènes communs ont été obtenus comme significativement modulés par ces miARN.

[0133] Classiquement il est admis qu'un miARN va directement agir sur ses ARNm cibles en vue de réprimer leur expression. La **Figure 12** montre l'enrichissement de gènes cibles contenant de la région complémentaire de la séquence de reconnaissance de ces miARN d'intérêt en réponse à 48h de transfection de chacun de ces miARN. Nous avons observé sur les 95 gènes modulés que 41 gènes sont significativement réprimés (voir le **Tableau X**).

[0134] Sur ces 41 gènes réprimés, 18 gènes sont des cibles prédites (par analyse *in silico*) communes aux 5 miARN sélectionnés (voir le **Tableau XI**) et dont la régulation par lesdits miARN pourraient jouer un rôle clé dans la différenciation de l'épithélium respiratoire et dans la mise en place d'une stratégie thérapeutique de maladies respiratoires (mucoviscidose, asthme, bronchopneumopathies obstructives chroniques, dyskinésie ciliaire primaire...).

Tableau IX : 41 gènes réprimés communs aux miARN mir-34a, mir-34b*, mir-34c-5p, mir-449a et mir-449b après transfection dans des HAECS de chacun des miARN d'intérêt.

Gene Description	Niveau d'expression en log2	Modulation en présence de mir34a	Modulation en présence de mir34b-5p	Modulation en présence de mir34c-5p	Modulation en présence de mir449a	Modulation en présence de mir449b
HIST1H3B	7,71	-0,57	-0,42	-0,74	-1,03	-0,66
CDC2	5,59	-0,57	-0,29	-0,64	-1,00	-0,67
DTL	6,47	-0,65	-0,38	-0,86	-0,97	-0,81
KLRK1/KLRC4	4,16	-0,78	-0,90	-0,85	-0,97	-0,62
KIAA0101	6,71	-0,88	-0,65	-0,84	-0,92	-0,72
NUF2	6,20	-0,91	-0,55	-0,68	-0,92	-0,75
HIST1H2BM	8,72	-0,44	-0,59	-0,69	-0,92	-0,66
RAD51AP1	5,42	-1,03	-0,60	-0,92	-0,87	-0,65
CENPK	6,38	-0,89	-0,60	-0,74	-0,83	-0,65
CCNB2	6,51	-0,65	-0,55	-0,59	-0,83	-0,77
KIF11	5,98	-0,43	-0,20	-0,58	-0,82	-0,54
NUSAP1	6,73	-0,49	-0,30	-0,45	-0,82	-0,51
TOP2A	7,06	-0,70	-0,21	-0,63	-0,80	-0,52
DEPDC1	5,22	-0,80	-0,39	-0,54	-0,80	-0,71
ASPM	5,73	-0,59	-0,32	-0,62	-0,77	-0,67

(suite)

	Gene Description	Niveau d'intensité d'expression en log2	Modulation en présence de mir34a	Modulation en présence de mir34b-5p	Modulation en présence de mir34c-5p	Modulation en présence de mir449a	Modulation en présence de mir449b
ARHGAP11B	Rho GTPase activating protein 11B	4,69	-0,82	-0,75	-0,71	-0,76	-0,84
HELLS	helicase, lymphoid-specific	5,95	-0,78	-0,55	-0,69	-0,74	-0,79
CENPI	centromere protein I	6,39	-0,54	-0,67	-0,69	-0,73	-0,91
CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	6,61	-0,64	-0,34	-0,57	-0,72	-0,51
BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	6,49	-0,54	-0,25	-0,54	-0,72	-0,60
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	7,72	-0,57	-0,29	-0,76	-0,71	-0,60
TTK	TTK protein kinase	5,11	-0,50	-0,39	-0,81	-0,69	-0,67
ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	8,43	-0,54	-0,48	-0,70	-0,69	-0,59
CEP55	centrosomal protein 55kDa	6,68	-0,52	-0,37	-0,62	-0,68	-0,64
TPX2	TPX2, microtubule- associated, homolog (Xenopus laevis)	6,89	-0,69	-0,42	-0,61	-0,68	-0,60
FOXM1	forkhead box M1	6,22	-0,64	-0,37	-0,38	-0,66	-0,56
AURKA	aurora kinase A	7,42	-0,51	-0,38	-0,51	-0,65	-0,66
CASC5	cancer susceptibility candidate 5	6,03	-0,47	-0,14	-0,45	-0,63	-0,59
SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	4,93	-0,46	-0,32	-0,49	-0,61	-0,52
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	7,81	-0,57	-0,48	-0,57	-0,60	-0,65

(suite)

	Gene Description	Niveau d'intensité d'expression en log2	Modulation en présence de mir34a	Modulation en présence de mir34b-5p	Modulation en présence de mir34c-5p	Modulation en présence de mir449a	Modulation en présence de mir449b
ARHGAP11A	Rho GTPase activating protein 11A	6,53	-0,40	-0,24	-0,46	-0,60	-0,53
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	6,33	-0,60	-0,46	-0,54	-0,59	-0,55
PRR11	proline rich 11	6,92	-0,59	-0,40	-0,69	-0,58	-0,67
CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	7,64	-0,38	-0,22	-0,57	-0,57	-0,52
FLJ27243	FLJ27243 protein	6,60	-0,48	-0,54	-0,47	-0,55	-0,65
LOC100130131	similar to melanoma antigen	6,14	-0,32	-0,44	-0,34	-0,54	-0,51
LOC100130131	similar to melanoma antigen	6,14	-0,32	-0,44	-0,34	-0,54	-0,51
DLGAP5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	6,64	-0,68	-0,09	-0,48	-0,52	-0,50
TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	7,35	-0,54	-0,57	-0,58	-0,51	-0,55
LOC253724	hypothetical LOC253724	3,82	-0,59	-0,70	-0,95	-0,51	-0,79
PLK4	polo-like kinase 4 (Drosophila)	6,23	-0,43	-0,18	-0,58	-0,50	-0,55

Tableau XI. Cibles prédites réprimées et communes à mir-449a, mir-449b, mir-34a, mir-34b* et mir-34c-5p et réprimées après transfection dans des HAECs de chacun des miARN sélectionnés.

Gene_Symbol	Gene Description	Niveau d'intensité d'expression en log2	Modulation en présence de mir34a	Modulation en présence de mir34b*	Modulation en présence de mir34c-5p	Modulation en présence de mir449a	Modulation en présence de mir449b
DTL	denticleless homolog (Drosophila)	6,47	-0,65	-0,38	-0,86	-0,97	-0,81
KLRK1/KLRC4	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	4,16	-0,78	-0,90	-0,85	-0,97	-0,62
KIAA0101	KIAA0101	6,71	-0,88	-0,65	-0,84	-0,92	-0,72
CENPK	centromere protein K	6,38	-0,89	-0,60	-0,74	-0,83	-0,65
CCNB2	cyclin B2	6,51	-0,65	-0,55	-0,59	-0,83	-0,77
KIF11	kinesin family member 11	5,98	-0,43	-0,20	-0,58	-0,82	-0,54
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	6,73	-0,49	-0,30	-0,45	-0,82	-0,51
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	7,06	-0,70	-0,21	-0,63	-0,80	-0,52
DEPDC1	DEP domain containing 1	5,22	-0,80	-0,39	-0,54	-0,80	-0,71
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	7,72	-0,57	-0,29	-0,76	-0,71	-0,60
ARHGDI	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	8,43	-0,54	-0,48	-0,70	-0,69	-0,59
CEP55	centrosomal protein 55kDa	6,68	-0,52	-0,37	-0,62	-0,68	-0,64
TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	6,89	-0,69	-0,42	-0,61	-0,68	-0,60
FOXM1	forkhead box M1	6,22	-0,64	-0,37	-0,38	-0,66	-0,56

(suite)

Gene_Symbol	Gene Description	Niveau d'intensité d'expression en log2	Modulation en présence de mir34a	Modulation en présence de mir34b*	Modulation en présence de mir34c-5p	Modulation en présence de mir449a	Modulation en présence de mir449b
AURKA	aurora kinase A	7,42	-0,51	-0,38	-0,51	-0,65	-0,66
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	7,81	-0,57	-0,48	-0,57	-0,60	-0,65
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	6,33	-0,60	-0,46	-0,54	-0,59	-0,55
CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	7,64	-0,38	-0,22	-0,57	-0,57	-0,52

[0135] Une analyse bioinformatique à l'aide du software Ingenuity Pathway Analysis software (IPA) (Ingenuity Systems, Mountain View, USA) a permis d'identifier des réseaux d'interaction entre ces gènes et d'associer des fonctions biologiques et des maladies aux résultats expérimentaux (voir la **Figure 13**).

[0136] Les voies régulées par l'expression des miARN sélectionnés sont des voies majeures de régulation du cycle cellulaire.

VI- Etude de l'impact fonctionnel de la suppression de l'expression des miR-449 sur la ciliogénèse

[0137] L'impact de l'extinction de l'expression des miR-449 sur la ciliogénèse a ensuite été étudié.

VI-A. Matériels et méthodes

Cellules HAECs

[0138] Six cultures indépendantes de cellules HAEC ont été transfectées avec un oligonucléotide dirigé contre les miR-449 et conjugué à une molécule de cholestérol ; la ciliogénèse a été évaluée au cours du temps de régénération.

[0139] Ces essais utilisent un oligonucléotide antisens du miR-449a (antagomir) lié en 3' par une liaison 2'-O-méthyl à une molécule de cholestérol et a pour séquence : 5'-a₅c₅c₅agcuaacaauacacugc₅c₅a-Chol-3' (SEQ. ID. N°207) (les liaisons phosphorothioate sont indiquées par l'indice _s) (obtenu après de Eurogentec (Seraing, Belgique)).

[0140] Cet antagomir cible le miR-449a d'*Homo sapiens* (correspondance complète) et le miR-449b avec un mésappariement.

[0141] Le contrôle négatif utilisé est le Clear-miR(tm) de séquence : 5'-c₅a₅uscgucgaucguagcg₅c₅a-Chol-3' (SEQ. ID. N°208) de Eurogentec.

[0142] L'antagomir (100 μM) a été pré-incubé dans du sérum de veau foetal (SVF) pendant 30 min RT. Ensuite, le mélange antagomir-SVF dans un milieu de différenciation (20 μM d'antagomir) est ajouté sur la face apicale des cellules HAECs primaires. Après 2h à 37°C, le mélange est retiré pour restaurer l'interface air-liquide.

[0143] La transfection est renouvelée tous les 5 jours avec un antagomir fraîchement préparé jusqu'à ce que les cellules de contrôles aient atteint une différenciation complète (généralement après 21 jours).

Xenopus laevis.

[0144] Les oligonucléotides morpholino (MO) dirigés contre les miR-449 (GeneTools, LLC, Philomath, Oregon, USA) ont pour séquence :

- MO-449a : 5'-ACCAGCTAACATTACACTGCCT-3' (SEQ. ID. N°209)
- MO-449b : 5'-GCCAGCTAAACTACACTGCCT- 3' (SEQ. ID. N°210)
- MO-449c: 5'-ACAGCCAGCTAGCAAGTGCCTGCC-3' (SEQ. ID. N°211)
- et le MO de contrôle : 5'-TGCACGTTTCAATACAGACCGT-3' (SEQ. ID. N°212)

[0145] Le MO anti-DLL1 utilisé est celui décrit par Morichika. et al. (Dev Growth Differ 52 (2), 235 (2010).)

VI-B. Résultats et discussions

[0146] Le miR-449 invalidé par son antagomir conduit à une réduction significative du nombre de cellules HAECs ciliées au stade ALI-D21 (moyenne de l'inhibition de la ciliogénèse: $2,3 \pm 0,3$, n = 6, P <0,001) (voir la **Figure 14**), parallèlement à une réduction du même ordre de l'expression de miR-449 (**Figure 14**, cliché b).

[0147] MiR-449 a également été invalidé dans les cellules d'embryons de Xénope par injection épidermique d'un mélange d'oligonucléotides morpholino ciblant le miR-449 mature. L'invalidation de miR-449 empêche la multiciliogénèse, tel que révélé par coloration à la tubuline acétylée au stade de développement embryonnaire du bourgeon caudal et chez les têtards (n = 112) (voir la **Figure 14**, clichés c à i).

[0148] La multiciliogénèse exige: (i) une sortie définitive du cycle cellulaire, suivie de (ii) d'une centriologénèse caractérisée par la multiplication de centaines de corps basaux, dérivés de centrioles nouvellement synthétisés ; (iii) la migration des corps basaux jusqu'à la membrane apicale où ils agissent en tant que centres d'organisation des microtubules et permettent l'assemblage des axonèmes mobiles.

[0149] Dans les deux modèles étudiés, le ratio de cellules tubuline-positives (coloration des cils) et de cellules centrine-2-positives (coloration des corps basaux) n'est pas affecté par la suppression de l'expression de miR-449, ce qui suggère que miR-449 agit avant la formation des centrioles.

[0150] Il est intéressant de noter que, alors que l'invalidation de miR-449 dans l'épiderme de Xénope supprime la

multiciliogénèse, elle n'a pas supprimé l'expression des ARNm des marqueurs des cellules ciliées incluant l' α -tubuline, Tex15 et le facteur de transcription Foxj1 (voir la **Figure 15**). Ces données indiquent que miR-449 est nécessaire à la différenciation terminale, mais pas à la spécification des cellules multiciliées, confirmant ainsi le rôle de miR-449 comme régulateur principal de la ciliogénèse chez les vertébrés.

VII- Effet d'une transfection de miR-449 sur les cibles de miR-449

[0151] Afin d'évaluer l'impact de miR-449 sur la ciliogénèse, il est apparu souhaitable de vérifier que les cibles de miR-449 étaient inhibées au cours de la différenciation terminale et après transfection de miR-449.

VII-A. Matériels et méthodes

Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux

[0152] Les cycles cellulaires de cellules A549 d'adénocarcinome du poumon sont synchronisées par une culture d'une nuit par carence en sérum puis transfectées avec les microARN ; les cellules sont ensuite cultivées en DMEM supplémenté avec L-glutamine et FCS à 10% jusqu'à 30% de confluence. Les cellules sont collectées 48h plus tard, fixées avec de l'éthanol 80% et colorées avec 0,1 ml d'une solution d'iodure de propidium (37°C, 30 minutes) contenant une RNase A (50 μ g/ml).

[0153] Les données sont lues sur un cytomètre en flux FACScalibur (Becton-Dickinson). Les pourcentages de cellule en phase G1, S et G2+M ont été calculés avec le logiciel Pro Cellquest.

Construction des plasmides et mesures de l'activité luciférase

[0154] Des séquences complètes ou partielles de la région 3' non traduite de Areg, Ccnb1, Ccne2, Cdc25a, Dll1 et Notch1 ont été amplifiées et clonées dans le vecteur psiCheck2 (Promega).

[0155] Les constructions de vecteurs psiCheck ainsi obtenues ont été cotransfectées avec des microARN synthétiques ou un contrôle négatif (Ambion, Applied System) dans des cellules HEK293T. L'activité luciférase est mesurée tel que décrit par Pottier et al. (PLoS One 4 (8), e6718 (2009)).

VII-B. Résultats

[0156] Les cibles de miR-449 ont été définies par l'analyse des profils d'expression suivants : (i) à quatre stades de régénération de cellules HAECs (ALI-D0, ALI-D7, ALI-D14, ALI-D21), (ii) avec cellules HAECs en multiplication transfectées avec miR-449. L'annotation fonctionnelle des ARNm différenciellement exprimés par Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (Edgar et al. Nucleic Acids Res 30 (1), 207 (2002)) révèle une augmentation significative des gènes associés au stade G2/M et à la ciliogénèse (voir la **Figure 16**).

[0157] Les transcrits modulés par miR-449 sont analysés avec des outils de prédictions de cibles des microARN (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index>) conduisant à l'identification de plusieurs cibles potentielles de ce microARN, qui ont été validés avec un test luciférase (**Figure 17**, clichés a, c).

[0158] Un premier groupe de cibles validées de miR-449a/b comprend l'amphiregulin (Areg), la cycline B1 (Ccnb1), la cycline E2 (Ccne2), et la cell division cycle 25 homolog A (Cdc25A), qui codent pour des protéines impliquées dans régulation du cycle cellulaire. En effet, la transfection de miR-449 conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (**Figure 17b**), tel que rapporté par Feng, M. et al. (Cell Cycle 9 (2), 213 (2010)), Lize et al. (Cell Death Differ (2009)), Noonan et al. (Oncogene 28 (14), 1714 (2009)) et Yang, X. et al. (Genes Dev 23 (20), 2388 (2009)), et est une étape cruciale avant le démarrage de la ciliogénèse.

[0159] Un deuxième groupe de cibles validées de miR-449 se compose de Notch1 et du ligand de Notch, DLL1 (**Figure 17c**). De façon intéressante, le blocage de la voie de signalisation Notch avec un antagoniste sécrétase gamma (DCT, 10 μ M) pendant la régénération des cellules HAEC potentialise significativement la ciliogénèse (**Figure 17d**) ce qui est en accord avec la revue de Tsao et al. (Development 136 (13), 2297 (2009)).

[0160] Ces résultats sont cohérents avec l'observation que les précurseurs des cellules ciliées de l'épiderme de Xénope expriment transitoirement le ligand Dll1 de Notch au moment de leur spécialisation et que l'expression de Dll1 diminue rapidement avec le temps parallèlement avec l'accumulation miR-449 dans ces progéniteurs (**Figure 17e**).

[0161] Comme cela pouvait être prévu à partir de cette observation, l'expression endogène de Dll1 est restée élevée dans les précurseurs des cellules ciliées des embryons modifiés avec le MO miR-449 (**Figure 17 e et f**) suggérant que miR-449 réprime l'expression de Dll1.

VIII- Effet de l'activité soutenue de Dll1 sur la ciliogénèse.

[0162] Les conséquences d'une activité soutenue de Dll1 sur la ciliogénèse a ensuite été évaluée.

[0163] L'injection d'un ARN synthétique de Dll1 dépourvue de site de liaison à miR-449 a pour conséquence (1) une spécialisation excessive des cellules ciliées, (2) une ciliogénèse déficiente dans la grande majorité de ces cellules, phénotype identique à celui observé chez les embryons déplétés en miR-449 (**Figure 17g**).

[0164] L'inhibition latérale par la signalisation Notch est connue pour supprimer l'identité de la cellule multiciliée. L'augmentation de la spécification des cellules ciliées observée après une surexpression de Dll1 est probablement causée par l'inhibition de l'activité de Notch, tel que rapporté par Deblandre et al. (Development 126 (21), 4715 (1999)).

[0165] Parallèlement, la suppression de l'expression de Dll1 endogène par des oligonucléotides morpholinos a conduit à une spécification excessive des cellules ciliées (**Figure 17g**). Ainsi, miR-449 peut déclencher la multiciliogénèse en réprimant l'expression de Dll1. À l'appui de ce modèle, une multiciliogénèse déficiente causée par l'extinction de l'expression de miR-449 est efficacement restaurée l'inhibition de la cible de miR-449, Dll1 (**Figure 17g**).

[0166] Ainsi ces résultats montrent que la répression de l'expression de Dll1 est au centre du mécanisme d'action de miR-449.

SEQUENCE LISTING

[0167]

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> utilisation de microARN pour le traitement de pathologies liées à un dysfonctionnement des cils des cellules épithéliales multiciliées

<130> F644 Cas251WO

<160> 212

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aacccguaga uccgaacuug ug 22

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

uaagugcug acagucaga u 21

<210> 3

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

uccugagac ccuuuaccu guga 24

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens
 <400> 4
 5 cagugcaaug uaaaaagggc au 22
 <210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 uaccacaggg uagaaccacg g 21
 <210> 6
 15 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 20 uaacacuguc ugguaaagau gg 22
 <210> 7
 <211> 22
 <212> RNA
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 ucagugcacu acagaacuuu gu 22
 30 <210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 8
 ucgaggagcu cacagucuag u 21
 <210> 9
 <211> 22
 40 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 45 uagcagcaca uaaugguuug ug 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> RNA
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 uagcagcacg uaaauauugg cg 22
 <210> 11
 55 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

	<400> 11	
	caaagugcuu acagugcagg uag	23
5	<210> 12	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 12	
	aacauucaac gcugucggug agu	23
	<210> 13	
	<211> 23	
15	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 13	
	caacggauc ccaaagcag cug	23
20	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 14	
	aacuggcccu caaagucccg cu	22
	<210> 15	
30	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 15	
35	ccccacaac cgcgcuugac uagcu	25
	<210> 16	
	<211> 22	
	<212> RNA	
40	<213> Homo sapiens	
	<400> 16	
	uaacacuguc ugguaacgau gu	22
45	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 17	
	uaauacugcc ugguaaugau ga	22
	<210> 18	
	<211> 23	
55	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 18	
	uaauacugcc ggguaaugau gga	23

	<210> 19	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 19	
	gugaaauguu uaggaccacu ag	22
10		
	<210> 20	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
15		
	<400> 20	
	uccuucuuuc caccggaguc ug	22
20		
	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 21	
	uagcuuauca gacugauguu ga	22
25		
	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
30		
	<400> 22	
	cugugcgugu gacagcggcu ga	22
35		
	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
40		
	<400> 23	
	aagcugccag uugaagaacu gu	22
45		
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 24	
	caagucacua gugguuccgu u	21
50		
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
55		
	<400> 25	
	aucacauugc cagggaauuc c	21
	<210> 26	
	<211> 21	

	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 26 aucacauugc cagggauuac c	21
	<210> 27	
	<211> 22	
10	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 27 cauugcacuu gucucggucu ga	22
15	<210> 28	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 28 uucaaguaau ccaggauagg cu	22
	<210> 29	
	<211> 21	
25	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 29 uucaaguaau ucaggauagg u	21
30	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 30 uucacagugg cuaaguucug c	21
	<210> 31	
40	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 31 uagcaccauc ugaaaucggu ua	22
	<210> 32	
	<211> 22	
	<212> RNA	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 32 uagcaccauu ugaaaucggu ua	22
55	<210> 33	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 33	
	uguaaacauc cuacacucag cu	22
5	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 34	
	uguaaacauc cuacacucuc agc	23
	<210> 35	
	<211> 22	
15	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 35	
	uguaaacauc cccgacugga ag	22
20	<210> 36	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 36	
	uguaaacauc cuugacugga ag	22
	<210> 37	
30	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 37	
35	aggcaagaug cuggcauagc u	21
	<210> 38	
	<211> 22	
40	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 38	
	uggcaguguc uuagcugguu gu	22
45	<210> 39	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 39	
	caaucacuaa cuccacugcc au	22
	<210> 40	
	<211> 23	
55	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 40	
	aggcagugua guuagcugau ugc	23

	<210> 41	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 41	
	uaaugccccc aaaaauccuu au	22
10		
	<210> 42	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
15		
	<400> 42	
	uuauaaauaca accugauaag ug	22
20		
	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 43	
	acuggacuug gagucagaag g	21
25		
	<210> 44	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
30		
	<400> 44	
	aaugacacga ucacucccg uga	23
35		
	<210> 45	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
40		
	<400> 45	
	uaauacuguc ugguaaaacc gu	22
45		
	<210> 46	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 46	
	uggcagugua uuguuagcug gu	22
50		
	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
55		
	<400> 47	
	aggcagugua uuguuagcug gc	22
	<210> 48	
	<211> 22	

<212> RNA
 <213> Homo sapiens

5 <400> 48
 cacgcucaug cacacacca ca 22

10 <210> 49
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

15 <400> 49
 uauugcacuc gucccggccu cc 22

20 <210> 50
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

25 <400> 50
 uggggagcug aggcucuggg ggug 24

30 <210> 51
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

35 <400> 51
 uuuggcacua gcacauuuuu gcu 23

40 <210> 52
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

45 <400> 52
 aaccgguaga uccgaucuug ug 22

50 <210> 53
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

55 <400> 53
 caagcuugua ucuauaggua ug 22

60 <210> 54
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

65 <400> 54
 ccgcacugug gguacuugcu gc 22

70 <210> 55
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

	<400> 55 acaggugagg uucuugggag cc	22
5	<210> 56 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 56 uucacauugu gcuacugucu gc	22
15	<210> 57 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
20	<400> 57 cagugguuuu acccuauggu ag	22
25	<210> 58 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
30	<400> 58 caucuuccag uacaguguug ga	22
35	<210> 59 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
40	<400> 59 aaaguucuga gacacuccga cu	22
45	<210> 60 <211> 21 <212> RNA <213> Homo sapiens	
50	<400> 60 cuagacugaa gcuccuugag g	21
55	<210> 61 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
	<400> 61 caggccauau ugugcugccu ca	22
	<210> 62 <211> 22 <212> RNA <213> Homo sapiens	
	<400> 62 ccaguauuaa cugugcugcu ga	22

	<210> 63	
	<211> 22	
	<212> RNA	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 63	
	acugcaguga aggcacuugu ag	22
10	<210> 64	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 64	
	accaucgacc guugauugua cc	22
20	<210> 65	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 65	
	gcugcgcuug gauuucgucc cc	22
25	<210> 66	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 66	
	cgggguuuug agggcgagau ga	22
35	<210> 67	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 67	
	ggggguguug ggcggaacug aucga	25
45	<210> 68	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 68	
	caucuaccg gacagugcug ga	22
50	<210> 69	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 69	
	caucuacug ggcagcauug ga	22
	<210> 70	
	<211> 22	

	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 70 cgucuuaccc agcaguguuu gg	22
	<210> 71	
	<211> 22	
10	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 71 cacuuuacaa auccugguga uc	22
15	<210> 72	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 72 gauuucagug gagugaaguu c	21
	<210> 73	
	<211> 21	
25	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 73 caacaccagu cgaugggcug u	21
30	<210> 74	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 74 gacacgcaca cugucgccga cu	22
	<210> 75	
40	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 75 aguucuucag uggcaagcuu ua	22
	<210> 76	
	<211> 23	
	<212> RNA	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 76 aaaauaggugc ccuagugacu aca	23
55	<210> 77	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 77	
	gggguuccug gggaugggau uu	22
5	<210> 78	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 78	
	uggguuccug gcaugcugau uu	22
	<210> 79	
	<211> 21	
15	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 79	
	aggcggagac uugggcaauu g	21
20	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 80	
	ccuauucuug guuacuugca cg	22
	<210> 81	
30	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 81	
35	ccuguucucc auuacuuggc uc	22
	<210> 82	
	<211> 22	
40	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 82	
	agagcuuagc ugauugguga ac	22
45	<210> 83	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
50	<400> 83	
	acugauuucu uuugguguuc ag	22
	<210> 84	
	<211> 22	
55	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 84	
	ugaccgauuu cuccuggugu uc	22

	<210> 85	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 85	
	cugggaggug gauguuuacu uc	22
10		
	<210> 86	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
15		
	<400> 86	
	cugggagaag gcuguuuacu cu	22
20		
	<210> 87	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 87	
	cuuucaguca gauguuugcu gc	22
25		
	<210> 88	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
30		
	<400> 88	
	cuuucagucg gauguuuaca gc	22
35		
	<210> 89	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 89	
	ugcuaugcca acauauugcc au	22
40		
	<210> 90	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
45		
	<400> 90	
	caaucagcaa guauacugcc cu	22
50		
	<210> 91	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
55		
	<400> 91	
	uaggcagugu cauuagcuga uug	23
	<210> 92	
	<211> 22	

	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 92 aaucacuaac cacacggcca gg	22
	<210> 93	
	<211> 22	
10	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 93 agggacuuuc aggggcagcu gu	22
15	<210> 94	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 94 cuuauacagau uguauuguaa uu	22
	<210> 95	
	<211> 22	
25	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 95 cuccugacuc cagguccugu gu	22
30	<210> 96	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 96 aucgggaaug ucguguccgc cc	22
	<210> 97	
40	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 97 auuaugacag accauuuugg ca	22
	<210> 98	
	<211> 22	
	<212> RNA	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 98 accgucacau aacaucgac ca	22
55	<210> 99	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	

EP 2 459 232 B1

	<400> 99		
	cagccacaac uaccugcca cu	22	
5	<210> 100		
	<211> 23		
	<212> RNA		
	<213> Homo sapiens		
10	<400> 100		
	ugagugugug ugugugagug ugu	23	
	<210> 101		
	<211> 22		
15	<212> RNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 101		
	auaacgugag cagggccgga gg	22	
20	<210> 102		
	<211> 24		
	<212> RNA		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 102		
	acccucgac uccgagaccc ccac	24	
	<210> 103		
30	<211> 22		
	<212> RNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 103		
35	aaucaugugc agugccaaua ug	22	
	<210> 104		
	<211> 22		
	<212> RNA		
40	<213> Homo sapiens		
	<400> 104		
	caagcugcu ucuauggguc ug	22	
	<210> 105		
45	<211> 80		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 105		
	ccuguugcca caaaccgua gauccgaacu ugugguauua guccgcacaa gcuuguaucu	60	
	auagguaugu gucuguuagg	80	
55	<210> 106		
	<211> 82		
	<212> DNA		

EP 2 459 232 B1

	<213> Homo sapiens	
	<400> 106	
5	ccugccgggg cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucuccgugcu accgcacugu	60
	ggguacuugc ugcuccagca gg	82
10	<210> 107	
	<211> 86	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 107	
	ugccagucuc uaggucccug agacccuuua accugugagg acauccaggg ucacagguga	60
	gguuuuuggg agccuggcgu cuggcc	86
20	<210> 108	
	<211> 89	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 108	
	ugcugcuggc cagagcucuu uucacauugu gcuacugucu gcaccuguca cuagcagugc	60
	aauguuuaaaa gggcauuggc cguguagug	89
30	<210> 109	
	<211> 100	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 109	
	ugugucucuc ucuguguccu gccagugguu uuacccuauug guagguuacg ucaugcuguu	60
40	cuaccacagg guagaaccac ggacaggaua ccggggcacc	100
45	<210> 110	
	<211> 95	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 110	
50	cggccggccc uggguccauc uuccaguaca guguuggaug gucuaauugu gaagcuccua	60
	acacugucug guaaagaugg cucccgggug gguuc	95
55	<210> 111	
	<211> 68	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 111	

EP 2 459 232 B1

	gaggcaaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acucagaac	60
	uuugucuc	68
5	<210> 112 <211> 90 <212> DNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 112	
	uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuaug uaugucucau ccccuacuag acugaagcuc	60
15	cuugaggaca gggauugguca uacucaccuc	90
20	<210> 113 <211> 83 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 113	
25	ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau	60
	ugugcugccu caaaaauaca agg	83
30	<210> 114 <211> 89 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 114	
35	gucagcagug ccuagcagc acguaaaauu uggcguaag auucuaaaaau uaucuccagu	60
	auuaacugug cugcugaagu aagguugac	89
40	<210> 115 <211> 84 <212> DNA <213> Homo sapiens	
	<400> 115	
45	gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga	60
	aggcacuugu agcauuauagg ugac	84
50	<210> 116 <211> 110 <212> DNA <213> Homo sapiens	
55	<400> 116	

EP 2 459 232 B1

	ugaguuuga gguugcuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aauiuaaauc	60
	aaaaccaucg accguugauu guacccuauug gcuaaccauc aucuacucca	110
5	<210> 117 <211> 92 <212> DNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 117	
	cggcuggaca gcgggcaacg gaaucccaaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu	60
15	gcgcuuggau uucguccccc gcucuccugc cu	92
	<210> 118 <211> 83 <212> DNA <213> Homo sapiens	
20	<400> 118	
	guggucucag aaucggggguu uugagggcgga gaugaguuua uguuuuaucc aacuggcccu	60
25	caaagucccg cuuuugggggu cau	83
	<210> 119 <211> 75 <212> DNA <213> Homo sapiens	
30	<400> 119	
	aguugguccg aguguugugg guuauuguua aguugauuuu acauugucuc cccccacaac	60
35	cgcgcuugac uagcu	75
	<210> 120 <211> 90 <212> DNA <213> Homo sapiens	
40	<400> 120	
	ccgggccccu gugagcaucu uaccggacag ugcuggauuu cccagcuuga cucuaacacu	60
45	gucugguaac gauguucaa ggugacccgc	90
	<210> 121 <211> 95 <212> DNA <213> Homo sapiens	
50	<400> 121	
55		

EP 2 459 232 B1

	ccagcucggg cagccguggc caucuucug ggcagcauug gauggaguca ggucucuaau	60
	acugccuggu aaugaugacg gcgagagccu gcacg	95
5	<210> 122 <211> 68 <212> DNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 122	
	cccucgucuu acccagcagu guuugggugc gguugggagu cucuaauacu gccggguaau	60
	gauggagg	68
15	<210> 123 <211> 110 <212> DNA <213> Homo sapiens	
20	<400> 123	
	guguugggga cugcgcgcu ggguccagug guucuaaca guucaacagu ucuguagcgc	60
25	aaugugaaa uguuuaggac cacuagaccc ggcgggcgcg gcgacagcga	110
30	<210> 124 <211> 110 <212> DNA <213> Homo sapiens	
35	<400> 124	
	aaagauccuc agacaaucca ugugcuucuc uuguccuua uuccaccgga gucugucua	60
	uacccaacca gauuucagug gagugaaguu caggaggcau ggagcugaca	110
40	<210> 125 <211> 72 <212> DNA <213> Homo sapiens	
45	<400> 125	
	ugucggguag cuuacagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca ccagucgaug	60
	ggcugucuga ca	72
50	<210> 126 <211> 110 <212> DNA <213> Homo sapiens	
55	<400> 126	

EP 2 459 232 B1

	acccggcagu gccuccaggc gcagggcagc cccugcccac cgcacacugc gcugccccag	60
	accacugug cgugugacag cggcugaucu gugccugggc agcgcgaccc	110
5	<210> 127 <211> 85 <212> DNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 127	
	ggcugagccg caguaguucu ucaguggcaa gcuuuuguc cugaccacgc uaaagcugcc	60
	aguugaagaa cuguugcccu cugcc	85
15	<210> 128 <211> 81 <212> DNA <213> Homo sapiens	
20	<400> 128	
	gggcuuucac gucacuagug guuccguuuu guagaugauu gugcauuguu ucaaaauggu	60
25	gcccuaugua cuacaaagcc c	81
	<210> 129 <211> 73 <212> DNA <213> Homo sapiens	
30	<400> 129	
	ggccggcugg gguuccuggg gaugggguuu gcuuccuguc acaaaucaca uugccaggga	60
35	uuuccaaccg acc	73
	<210> 130 <211> 97 <212> DNA <213> Homo sapiens	
40	<400> 130	
	cucaggugcu cuggcugcuu gggguuccugg caugcugauu ugugacuuaa gauuaaaauc	60
45	acauugccag ggauuaccac gcaaccacga ccuuggc	97
	<210> 131 <211> 84 <212> DNA <213> Homo sapiens	
50	<400> 131	
	ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu	60
55	ugucucgguc ugacagugcc ggcc	84

	<210> 132		
	<211> 77		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 132		
	guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu	60	
10	uacuugcacg gggacgc	77	
	<210> 133		
	<211> 77		
	<212> DNA		
15	<213> Homo sapiens		
	<400> 133		
	ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua	60	
20	cuuggcucgg ggaccgg	77	
	<210> 134		
	<211> 97		
25	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 134		
30	accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug	60	
	uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug	97	
	<210> 135		
35	<211> 64		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 135		
40	augacugauu ucuuuuggug uucagaguca auauaauuuu cuagcaccau cugaaaucgg	60	
	uuau	64	
45	<210> 136		
	<211> 88		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 136		
	aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc	60	
55	auuugaaauc gguuaugaug uaggggga	88	
	<210> 137		
	<211> 88		
	<212> DNA		

EP 2 459 232 B1

<213> Homo sapiens

<400> 137

5	accaaguuuu aguucaugua aacauccuac acucagcugu aaucacugga uuggcuggga	60
	gguggauguu uacuucagcu gacuugga	88

<210> 138

10 <211> 89

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 138

15	accaugcugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg	60
	agaggguguu uuacuccuuc ugccaugga	89

20 <210> 139

<211> 70

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25 <400> 139

30	guuguuguaa acauccccga cuggaagcug uaagacacag cuaagcuuuc agucagaugu	60
	uugcugcuac	70

<210> 140

<211> 92

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35 <400> 140

40	gggcagucuu ugcucugua aacauccuug acuggaagcu guaagguguu cagaggagcu	60
	uucagucgga uguuuacagc ggcaggcugc ca	92

<210> 141

<211> 71

<212> DNA

45 <213> Homo sapiens

<400> 141

50	ggagaggagg caagaugcug gcuaugcugu ugaacuggga accugcuang ccaacauuu	60
	gccaucuuuc c	71

<210> 142

<211> 110

<212> DNA

55 <213> Homo sapiens

<400> 142

EP 2 459 232 B1

	ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aauguaagg	60
	aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu uguggggccc	110
5	<210> 143 <211> 84 <212> DNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 143	
	gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug uggugguuac aaucacuaac	60
	uccacugcca ucaaaacaag gcac	84
15	<210> 144 <211> 77 <212> DNA <213> Homo sapiens	
20	<400> 144	
	agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac	60
25	ggccagguua aaagauu	77
	<210> 145 <211> 87 <212> DNA <213> Homo sapiens	
30	<400> 145	
	accgcaggga aaaugaggga cuuuuggggg cagauguguu uccauuccac uaucauaaug	60
35	ccccuaaaaa uccuuauugc ucuugca	87
	<210> 146 <211> 72 <212> DNA <213> Homo sapiens	
40	<400> 146	
	uacaucggcc auuauauac aaccugauaa guguuauagc acuuaucaaga uuguauugua	60
	auugucugug ua	72
	<210> 147 <211> 66 <212> DNA <213> Homo sapiens	
50	<400> 147	
	agggcuccug acuccagguc cuguguguua ccuagaaaua gcacuggacu uggagucaga	60
55	aggccu	66

	<210> 148		
	<211> 87		
	<212> DNA		
5	<213> Homo sapiens		
	<400> 148		
	gaaagcgcuu uggaaugaca cgaucacucc cguugagugg gcacccgaga agccaucggg	60	
10	aaugucgugu ccgcccagug cucuuuc	87	
	<210> 149		
	<211> 83		
	<212> DNA		
15	<213> Homo sapiens		
	<400> 149		
	cgccggccga ugggcgucuu accagacaug guuagaccug gccucuguc uaauacuguc	60	
20	ugguaaaacc guccauccgc ugc	83	
	<210> 150		
	<211> 91		
25	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 150		
	cuguguguga ugagcuggca guguaauuguu agcugguuga auaugugaau ggcaucggcu	60	
30	aacaugcaac ugcugucuua uugcauauac a	91	
	<210> 151		
35	<211> 97		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 151		
40	ugaccugaau cagguaggca guguaauuguu agcuggcugc uugggucaag ucagcagcca	60	
	caacuacccu gccacuugcu ucuggauaaa uucuucu	97	
	<210> 152		
45	<211> 96		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 152		
	gggaccugcg ugggugcggg cgugugagug ugugugugug aguguguguc gcuccggguc	60	
	cacgcucaug cacacaccca cacgcccaca cucagg	96	
55	<210> 153		
	<211> 96		
	<212> DNA		

EP 2 459 232 B1

<213> Homo sapiens

<400> 153

5	cgggcccccg gcgggcggga gggacgggac gcggugcagu guuguuuuuu cccccgccaa	60
	uauugcacuc gucccggccu ccggcccccc cgcccc	96

<210> 154

10 <211> 82

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 154

15	ugugggcagg gccucgggga gcugaggcuc uguggguggc cggggcugac ccugggccuc	60
----	---	----

20	ugcuccccag ugucugaccg cg	82
----	--------------------------	----

<210> 155

<211> 78

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<400> 155

30	uggccgauuu uggcacuagc acauuuuugc uugugucucu ccgcucugag caaucaugug	60
	cagugccaau augggaaa	78

<210> 156

<211> 81

<212> DNA

35 <213> Homo sapiens

<400> 156

40	cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucgcuu	60
	cuaugggucu gugucagugu g	81

<210> 157

45 <211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 157

50	ugagguagua gguuguauag uu	22
----	--------------------------	----

<210> 158

<211> 22

<212> RNA

55 <213> Homo sapiens

<400> 158

	ugagguagua gguugugugg uu	22
--	--------------------------	----

	<210> 159	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 159	
	ugagguagua gguuguauagg uu	22
10		
	<210> 160	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
15		
	<400> 160	
	ugagguagga gguuguauag uu	22
20		
	<210> 161	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 161	
	ugagguagua gauuguauag uu	22
25		
	<210> 162	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
30		
	<400> 162	
	ugagguagua guuuguacag uu	22
35		
	<210> 163	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
40		
	<400> 163	
	cuauacaauac uacugucuuu c	21
45		
	<210> 164	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 164	
	cuauacaacc uacugccuuc cc	22
50		
	<210> 165	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> Homo sapiens	
55		
	<400> 165	
	uagaguuaca cccugggagu ua	22
	<210> 166	
	<211> 22	

	<212> RNA		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 166 cuauacggcc uccuagcuuu cc	22	
	<210> 167		
	<211> 22		
10	<212> RNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 167 cuauacaauuc uauugccuuc cc	22	
15	<210> 168		
	<211> 21		
	<212> RNA		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 168 cuguacaggc cacugccuug c	21	
	<210> 169		
	<211> 80		
25	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 169		
30	ugggaugagg uaguagguug uauaguuuuu gggucacacc caccacuggg agauaacuau	60	
	acaauucuacu gucuuuuccua	80	
	<210> 170		
35	<211> 83		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 170		
40	cggggugagg uaguagguug ugugguuuca gggcagugau guugccccuc ggaagauaac	60	
	uauacaaccu acugccuucc cug	83	
	<210> 171		
	<211> 84		
	<212> DNA		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 171		
	gcauccgggu ugagguagua gguuguaugg uuuaagagua caccucugga guuaacugua	60	
	caaccuucua gcuuuuccuug gagc	84	
55	<210> 172		
	<211> 79		
	<212> DNA		

	<213> Homo sapiens	
	<400> 172	
5	ccccgggcuga gguaggaggu uguauaguug aggaggacac ccaaggagau cacuauacgg	60
	ccuccuagcu uuccccagg	79
10	<210> 173 <211> 87 <212> DNA <213> Homo sapiens	
15	<400> 173	
	ucagagugag guaguagauu guauaguugu gggguaguga uuuuaccug uucaggagau	60
	aacuauacaa ucuauugccu ucccuga	87
20	<210> 174 <211> 84 <212> DNA <213> Homo sapiens	
25	<400> 174	
	aggcugaggu aguaguugu acaguugag ggucuaugau accacccggu acaggagaua	60
	acuguacagg ccacugccuu gcca	84
30	<210> 175 <211> 7 <212> DNA <213> Homo sapiens	
35	<400> 175 ggcagug 7	
40	<210> 176 <211> 7 <212> RNA <213> Homo sapiens	
45	<400> 176 aauacu 7	
50	<210> 177 <211> 7 <212> RNA <213> Homo sapiens	
	<400> 177 aucacua 7	
55	<210> 178 <211> 1889 <212> DNA <213> Homo sapiens	

<400> 178

	atgacatttc aaggatagaa gtataacctga ttttttttcc ttttaatttt cctggtgcca	60
5	atttcaagtt ccaagttgct aatacagcaa caatttatga attgaattat cttggttgaa	120
	aataaaaaga tcactttctc agttttcata agtattatgt ctcttctgag ctatttcac	180
	tatttttggc agtctgaatt tttaaaaccc attttaaattt ttttccttac ctttttattt	240
10	gcatgtggat caaccatcgc tttattggct gagatatgaa catattgttg aaaggttaatt	300
	tgagagaaat atgaagaact gaggaggaaa aaaaaaaaaa agaaaagaac caacaacctc	360
	aactgcctac tccaaaatgt tggatcatttt atgttaaggg aagaattcca ggggtatggc	420
15	atggagtgtg caagtatgtg ggcagatttt cagcaaactc tttcccact gttaaaggag	480
	ttagtggatt actgccattc acttcataat ccagtaggat ccagtgatcc ttacaagtta	540
	gaaaacataa tcttctgcct tctcatgatc caactaatgc cttactcttc ttgaaatttt	600
20	aacctatgat attttctgtg cctgaatatt tgttatgtag ataacaagac ctcagtgcct	660
	tcctgttttt cacattttcc ttttcaaata gggcttaact cagcaactcg ctttaggtca	720
	gcagcctccc tgaagacc aaattagaata tccatgacct agttttccat gcgtgtttct	780
25	gactctgagc tacagagtct ggtgaagctc acttctgggc ttcattctggc aacatcttta	840
	tccgtagtgg gtatggttga cactagccca atgaaatgaa ttaaagtga ccaatagggc	900
	tgagctctct gtgggctggc agtcctggaa gccagctttc cctgcctctc atcaactgaa	960
30	tgaggctcagc atgtctattc agcttcgttt attttcaaga ataatcacgc tttcctgaat	1020
	ccaaactaat ccatcaccgg ggtgggttag tggctcaaca ttgtgttccc atttcagctg	1080
	atcagtgggc ctccaaggag gggctgtaaa atggaggcca ttgtgtgagc ctatcagagt	1140
35	tgctgcaaac ctgaccctg ctcagtaaag cacttgcaac cgtctgttat gctgtgacac	1200
	atggccccctc cccctgccag gagctttgga cctaatacaa gcatcccttt gccagaaaag	1260
40	aagatggggg aggaggcagt aataaaaaga ttgaagtatt ttgctggaat aagttcaa	1320
	tcttctgaac tcaaactgag gaatttcacc tgtaaactg agtcgtacag aaagctgcct	1380
	ggatatatcca aaagcttttt attcctcctg ctcattattgt gattctgcct ttggggactt	1440
45	ttcttaaacc ttcagttatg attttttttt catacactta ttggaactct gcttgatttt	1500
	tgctcttcc agtcttcctg acactttaat taccaacctg ttacctactt tgactttttg	1560
	catttaaaac agacactggc atggatatag ttttactttt aaactgtgta cataactgaa	1620
50	aatgtgctat actgcatact ttttaaagt aaagatatatt ttatctttat atgaagaaaa	1680
	tcacttagga aatggctttg tgattcaatc tgtaaactgt gtattccaag acatgtctgt	1740
	tctacataga tgcttagtcc ctcattgcaaa tcaattactg gtccaaaaga ttgctgaaat	1800
55	tttatatgct tactgatata ttttacaatt ttttatcatg catgtcctgt aaaggttaca	1860
	agcctgcaca ataaaaatgt ttaacggtt	1889

EP 2 459 232 B1

<210> 179
 <211> 301
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5
 <400> 179
 ctgaagataa aattacagga tatcacattg gagtcactgc caagtcatag ccataaatga 60
 10 tgagtcgggc ctctttccag tggatcataa gacaatggac cttttttgtt atgatgggtt 120
 taaactttca attgtcactt tttatgctat ttctgtatat aaagggtgcac gaaggtaaaa 180
 agtatttttt caagttgtaa ataatttatt taatatttaa tggaagtgtt tttattttac 240
 15 agctcattaa acttttttaa ccaaacagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 300
 a 301

<210> 180
 <211> 776
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20
 <400> 180
 25 gaatcgtgca gggggagaaa tccttgagcc agggctgcca tataacctga caggaacatg 60
 ctactgaagt ttattttacc attgactgct gccctcaatc tagaacgcta cacaagaaat 120
 30 atttgtttta ctcagcagggt gtgccttaac ctccctattc agaaagctcc acatcaataa 180
 acatgacact ctgaagtga agtagccacg agaattgtgc tacttatact ggttcataat 240
 ctggaggcaa gggtcgactg cagccgcccc gtcagcctgt gctaggcatg gtgtcttcac 300
 35 aggaggcaaa tccagagcct ggctgtgggg aaagtgacca ctctgccctg accccgatca 360
 gttaaggagc tgtgcaataa ccttcctagt acctgagtga gtgtgtaact tattgggttg 420
 gcgaagcctg gtaaagctgt tggaatgagt atgtgattct ttttaagtat gaaaataaag 480
 40 atatatgtac agacttgtat tttttctctg gtggcattcc tttaggaatg ctgtgtgtct 540
 gtccggcacc ccggtaggcc tgattggggt tctagtcctc cttaccact tatctcccat 600
 45 atgagagtgt gaaaaatagg aacacgtgct ctacctccat ttagggattt gcttgggata 660
 cagaagaggc catgtgtctc agagctgtta agggcttatt tttttaaac attggagtca 720
 tagcatgtgt gtaaaactta aatatgcaaa taaataagta tctatgtcta aaaaaa 776

50
 <210> 181
 <211> 504
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

55
 <400> 181

EP 2 459 232 B1

agcaaagagg aaagcagacc catggctcag gacaagctcc cagtgatcac tcaagaatct 60
 ggctctcatt ctaagaggct gtgctgcca gtatggtggt tgtgataaat ctaaaccagc 120
 5 cctgcatgaa acagagtcca agctgtctcc caacagcctg ggttcgggcc ttggctggcc 180
 caggccagtg taagcctgtg gccaccaagc agctcatctg agcactttgg gatgtattca 240
 gcctacgttg ccctggaaaa ggaagcagga gatgtctccc tgtgggaaag gagaagagaa 300
 10 gttgtctctg agtccccctgt caccagtgg attcatttct tggaagagcc agaatgagcc 360
 actttgacca ccctcgggtg ctatgggtga cacaagagct gtccactggg tgtttgcaga 420
 ataattacac tatcttatgt ctggatcctg atgatttcac agctaaatgg caaaaataaa 480
 15 acatgtttcc cataaaaaaa aaaa 504

<210> 182

<211> 622

<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<400> 182

cttgtaaact tgagttggag tactatatatt acaaataaaa ttggcaccat gtgccatctg 60
 25 tacatattac tgttgcatatt acttttaata aagcttgtgg ccccttttac ttttttatag 120
 cttaactaat ttgaatgtgg ttacttccta ctgtagggta gcggaaaagt tgtcttaaaa 180
 30 ggtatggtgg ggatattttt aaaaactcct tttggtttac ctggggatcc aattgatgta 240
 tatgtttata tactgggttc ttgttttata tacctggctt ttactttatt aatatgagtt 300
 actgaagggtg atggagggtat ttgaaaattt tacttccata ggacatactg catgtaagcc 360
 35 aagtcattgga gaatctgctg catagctcta ttttaaagta aaagtctacc accgaatccc 420
 tagtccccct gttttctggt tcttcttggt attgctgcca taattctaag ttattttactt 480
 ttaccactat ttaagttatc aacttttagct agtatcttca aactttcact ttgaaaaatg 540
 40 agaattttat attctaagcc agttttcatt ttggttttgt gttttgggta ataaaacaat 600
 actcaaatac aaaaaaaaaa aa 622

<210> 183

<211> 1424

<212> DNA

45 <213> Homo sapiens

<400> 183

50

55

EP 2 459 232 B1

	agaagataac taagcaaaca agttggaatt caccaagatt gggtagaact ggtatcactg	60
	aactactaaa gttttacaga aagtagtgct gtgattgatt gccctagcca attcacaagt	120
5	tacactgcca ttctgatttt aaaacttaca attggcacta aagaatacat ttaattat	180
	cctatgttag ctgttaaaga aacagcagga cttgtttaca aagatgtcct cattcccaag	240
	gttactggat agaagccaac cacagtctat accatagcaa tgtttttcct ttaatccagt	300
10	gttactgtgt ttatcttgat aaactaggaa ttttgtcact ggagttttgg actggataag	360
	tgctacctta aaggggtatac taagtgatac agtactttga atctagttgt tagattctca	420
	aaattcctac actcttgact agtgcaattt gggtcttgaa aattaaattt aaacttgttt	480
15	acaaagggtt agttttgtaa taagggtgact aatttatcta tagctgctat agcaagctat	540
	tataaaactt gaatttctac aaatggtgaa atttaatgtt ttttaacta gtttatttgc	600
	cttgccataa cacatttttt aactaataag gcttagatga acatgggtgt caacctgtgc	660
20	tctaaacagt gggagtacca aagaaattat aaacaagata aatgctgtgg ctccttcta	720
	actggggcct tcttgacatg taggttgctt ggtaataacc ttttgtata tcacaatttg	780
	ggtgaaaaac ttaagtaccc tttcaaacta tttatatgag gaagtcactt tactactcta	840
25	agatatccct aaggaatttt tttttttaat ttagtgtgac taaggcttta tttatgtttg	900
	tgaaactgtt aagggtcctt ctaaattcct ccattgtgag ataaggacag tgtcaaagtg	960
	ataaagctta acacttgacc taaacttcta ttttcttaag gaagaagagt attaaatata	1020
30	tactgactcc tagaaatcta tttattaaaa aaagacatga aaacttgctg tacataggct	1080
	agctatttct aaatatttta aattagcttt tctaaaaaaa aaatccagcc tcataaagta	1140
	gattagaaaa ctagattgct agtttatttt gttatcagat atgtgaatct cttctccctt	1200
35	tgaagaaact atacatttat tgttacggtg tgaagtcctt tgtatagttt gtttttaaac	1260
	taatatttgt ttcagtattt tgtctgaaaa gaaaacacca ctaattgtgt acatatgtat	1320
	tatataaact taacctttta atactgttta ttttttagccc attgtttaaa aaataaaagt	1380
40	taaaaaaatt taactgctta aaagtaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	1424

<210> 184

<211> 1160

<212> DNA

45 <213> Homo sapiens

<400> 184

50	attcttctct tacacccac ccgaaagtat tcagctggca tttagagagc tacagtcttc	60
	attttagtgc tttacacatt cgggcctgaa aacaaatatg acctttttta cttgaagcca	120
	atgaatttta atctatagat tctttaatat tagcacagaa taatatcttt gggctcttact	180
55	atttttaccc ataaaagtga ccaggtagac cttttttaat tacattcact acttctacca	240
	cttggtgata tctagccaat gtgcttgcaa gtgtacagat ctgtgtagag gaatgtgtgt	300
	atatttacct cttcgtttgc tcaaacaatga gtgggtattt tttgtttgt ttttttgtt	360

EP 2 459 232 B1

	gttggtggtt ttgaggcgcg tctcaccctg ttgcccaggc tggagtgcaa tggcgcggttc	420
	tctgctcact acagcaccgc cttcccagggt tgaagtgatt ctcttgccctc agcctcccga	480
5	gtagctggga ttacaggtgc ccaccaccgc gccagctaa tttttaatt tttagtagag	540
	acagggtttt accatgttgg ccaggctggc cttgaactcc tgaccctcaa gtgatctgcc	600
	caccttggcc tccctaagtg ctgggattat aggcgtgagc caccatgctc agccattaag	660
10	gtattttggt aagaacttta agtttaggggt aagaagaatg aaaatgatcc agaaaaatgc	720
	aagcaagtcc acatggagat ttggaggaca ctggttaaag aatttatttc tttgtatagt	780
	atactatggt catggtgcag atactacaac attgtggcat tttagactcg ttgagtttct	840
15	tgggcactcc caagggcggt ggggtcataa ggagactata actctacaga ttgtgaatat	900
	atttattttc aagttgcatt ctttgtcttt ttaagcaatc agatttcaag agagctcaag	960
	ctttcagaag tcaatgtgaa aattccttcc taggctgtcc cacagtcttt gctgccctta	1020
20	gatgaagcca cttgtttcaa gatgactact ttgggggttg gttttcatct aaacacattt	1080
	ttccagtctt attagataaa ttagtccata tggttggtta atcaagagcc ttctgggttt	1140
	ggtttggttg cattaaatgg	1160

25

<210> 185
 <211> 1778
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 185

35

40

45

50

55

EP 2 459 232 B1

	gggcggcagg accagccagc agcagcccaa gcttccctcc atcccccttt accctctttg	60
	ctgcagagaa acttaagcaa aggggacagc tgtgtgacat ttggagaggg ggcctgggac	120
5	ttccatgcct taaacctacc tcccacactc ccaagggttg agcccagggc atcttgctgg	180
	ctacgcctct tctgtccctg ttagacgtcc tccgtccata tcagaactgt gccacaatgc	240
	agttctgagc accgtgtcaa gctgctctga gccacagtgg gatgaaccag ccggggcctt	300
10	atcgggctcc agccatctca tgaggggaga ggagacggag gggagtagag aagttacaca	360
	gaaatgctgc tggccaaata gcaaagacaa cctgggaagg aaaggctctt gtgggataat	420
	ccatatgttt aattttattca acttcatcaa tcactttatt ttatTTTTTT ttctaactcc	480
15	tggagactta ttttactgct tcattagggt gaaatactgc cattctaggt agggttttat	540
	tatcccaggg actacctcg cttttaattt aaaaaaaaaa aagaagtggg taagaaaatg	600
	caaacctgtt ataagttatc ggacagaaaag ctaggtgctc tgtcaccccc aggaggcgct	660
20	gtggtactgg ggctgctgct atttaagcca agaactgagg tcctggtgag agcgttggac	720
	ccaggcttgg ctgcctgaca taagctaaat ctcccagacc caccactggc taccgatatc	780
	tatttggtgg gaggtgtggc cctgttcttc ctaccccag ttccatgaca ttggctggta	840
25	taggagccac agtcaggaaa gcacttgagg cagcatctgt tgggccaccc ccggctcagt	900
	gctggaatgt tgcagtgtag gtttcccagg gaaggggggt gggggtaggt gggctccaca	960
	F644_251PCT_S125	
30	ggatggggga ggagcatgtc cactgagtat cttccttatg ttgctgtgat attgatagct	1020
	tttattttct aattttttaa aaatgggtcat attatgagtc aaagagtatc aaatcagtgt	1080
	tggatggacc acccaagggg gagggagagg gctggaagcc ctgggcatta ggagaaggga	1140
35	gtgggtgctg gcatggacat gactggatag aattttctca ggaggagact tgggtggattt	1200
	tgaaggtaaa actttctggg tttatcatgt ttttaatttta gagacagggg gtgatgaatc	1260
	atcacgggtt gtcccccttat ctaactccat aaaagtggga atttcaaaag aacacctcat	1320
40	ccaaggagct ggggcagact tcattgattc tagagagacc tgtttcagtg cctactcatc	1380
	cctgccctct ggtgccagcc tccttaccat cacggcttca ctgaggtgta ggtgggtttt	1440
	tcttaaacag gagacagtct ctccccctct acctcaactt cttggggtgg gaatcagtga	1500
45	tactggagat ggctagttgc tgtgttacgg gtttgagtta catttggtta taaaacaatc	1560
	ttgttgggaa aaatgtgggg gagaggactt cttcctacac gcgcattgag acagattcca	1620
	actggttaat gatattgttt gtaagaaaga gattctgttg gttgactgcc taaagagaaa	1680
50	ggtgggatgg ccttcagatt ataccagctt agctagcatt actaaccaac tgttggaagc	1740
	tctgaaaata aaagatcttg aaccataaaa aaaaaaaaaa	1778

<210> 186

<211> 759

<212> DNA

<213> Homo sapiens

EP 2 459 232 B1

<400> 186

	aaggatgttt tcttttttca cacagtaaaa attcttatca ttcaaggata ttggaaccac	60
5	aggactatgtt ggataaaaaa cattatttgc aaattaatgc gcataggcca tcttactttt	120
	attgcaaaat ggcattgtgt gccatctatt attcattttt aaatgggtcat ttcttattca	180
	gtgagtgttt tagtgtttta aactatatgg ataagaatgc aggtagataa tattctaggc	240
10	ataaaacatt taatgtacct tacctcatgc aatattcttt ggattctttg ttgatttatg	300
	atattgctaa tataatattt tcttaaaata tataacaata tcttttatgc attttgagtt	360
	ccagctggtg cttctttata tttagaaatt ataatgggaa ggatcatttaa ttacagatg	420
15	gttttaaaat tgaggtaata tctgaggtgg cataatttaa aaatatttag caaatttggt	480
	tcatatatac tgtcttattt ctagatttgt ttaaaattgg aatatgaaaa actaatggat	540
	aaagctagca taaaattgat attttagttt gtattattaa tatatcatgt taccttatat	600
20	attaatctac tcttgattct gctaattatt accaacaaaa ttgtattcat gacattttat	660
	taatcctctg tgaattttct gtaaataaaa ttatttctga aaatctctaa aaaaaaaaaa	720
	aaaaaaaaaa agaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	759

25

<210> 187
 <211> 956
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 187

35

40

45

50

55

EP 2 459 232 B1

	caaaataagt atttgttttg atattaaaag attcaatact gtattttctg ttagcttgtg	60
	ggcattttga attatatatt tcacattttg cataaaactg cctatctacc tttgacactc	120
5	cagcatgcta gtgaatcatg tatcttttag gctgctgtgc atttctcttg gcagtgatac	180
	ctccctgaca tggttcatca tcaggctgca atgacagaat gtggtgagca gcgtctactg	240
	agactactaa cattttgcac tgtcaaaaata cttggtgagg aaaagatagc tcaggttatt	300
10	gctaattgggt taatgcacca gcaagcaaaa tattttatgt tttgggggtt tgaaaaatca	360
	aagataatta accaaggatc ttaactgtgt tcgcattttt tatccaagca cttagaaaac	420
	ctacaatcct aattttgatg tccattgtta agagggtgtg atagatacta tttttttttt	480
15	catattgtat agcggttatt agaaaagttg gggattttct tgatctttat tgctgcttac	540
	cattgaaact taaccagct gtgttcccca actctgttct gcgcacgaaa cagtatctgt	600
	ttgaggcata atcttaagtg gccacacaca atgttttctc ttatgttatc tggcagtaac	660
20	tgtaacttga attacattag cacattctgc ttagctaaaa ttgttaaaat aaactttaat	720
	aaacccatgt agccctctca tttgattgac agtatttttag ttatttttgg cattcttaaa	780
	gctgggcaat gtaatgatca gatctttgtt tgtctgaaca ggtattttta tacatgcttt	840
25	ttgtaaacca aaaactttta aatttcttca ggttttctaa catgcttacc actgggctac	900
	tgtaaatgag aaaagaataa aattatttaa tgtttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	956

30	<210> 188
	<211> 1223
	<212> DNA
	<213> Homo sapiens
35	<400> 188

40

45

50

55

EP 2 459 232 B1

	cacccagccc ctctaggttt cagtttccctt atttctgagt gaagatgatg atgttggcta	60
	tgtcttctcc atgggggtttt tatgagtatc aaacaagttg aaatactctt cttgatgtga	120
5	atgcctgttc tcctgttctt cttttgcaga ttgctttact tgctctgctt cccagagatc	180
	cgcttctttt cttctctgct ttcttctttc tgccccctct cctccccctc ctcttcttcc	240
	tcccattctt acccctttct agagattcat tttcactact ttattcagaa taacatctat	300
10	agcaaagatt tctacttctt tcccgtatga cttttctccc cagctccaaa cctcatattt	360
	ctgattgcct caggatagtt cccttttgag atactttcct gtcttttagct caatctcaac	420
	acattgaaaa cacaactcat tcacttgaaa aacacttact aaaatctcac tatatgctag	480
15	gcagtatgtt aagcatgcat attgctctct ctaaaaatca gttctgtagg aatccctttc	540
	ccctcctgat ggtctcatcc ttatcctggt ctccccactca gggaacctcc tgattattct	600
	gctctgtgct tcctcagttc accctttgct ctcttttctt ttgcttcacc tagtcacatc	660
20	ctgtgtgcct gacagccagt ctgctgtaat tgtcttagaa ctgatcctct tgactccaca	720
	ccactgctag gttgaacatc taaaagtcct gtgctgatcc tctcagtcct ctgctcatca	780
	actctcaagg acaacctatt accaaacacc ttgacctca acctctggag tcctcagccc	840
25	aggacttgaa gttaggagat ctttttttgc cttggctctg ccataaatac accctgtaac	900
	cttggatgtg ttgcaacatc tgcaaggata ggaatttgat cactgctaag gttccttcaa	960
30	acttgatcag ttgctgttct tgtcttttgg atgttaattc acattcatct cctatattaa	1020
	gactttggct aagtcttgtg atttcttgcc ttattggagc ttttcttcta atctgaattc	1080
	ttgcttctct ctcttttcc ttacacacc cacacaagtc ctaacctctc caggaagtgt	1140
35	tttgaaatga tgttacctgg gtttgagttc ttggcattag cctgtatcat ctatttggtg	1200
	ttattatact attatagctg ttt	1223

<210> 189

<211> 2770

40 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 189

45

50

55

EP 2 459 232 B1

	cctgccgctt	tgccagggtg	gggtgggatc	aaacgccctg	agagtcccgg	atgtccgagg	60
	cgggatgcaa	accatcccgt	cctgagcacg	ggtccttcct	ctctctttca	tccacacttc	120
5	tgtttaacttc	ccaccaccat	caatcatctg	atttcctgaa	agtaattaat	tgtgcattta	180
	ataccagtta	gagttccgac	tctgcatggg	gtcacagtga	aagcgccgac	tgacttatgg	240
	ttttgattca	agaatcgtct	tattctggaa	gtagatctga	ataggctacc	ggagccttgt	300
10	ttttctaaag	gggggcgctg	tctagcactt	aactagggta	agcattctta	acatgtattt	360
	ccacttgccc	tgagtaaata	tgtggtgaga	gaagcttcct	ttctgcagtt	taaaaaagct	420
	actgcttcct	taggcttcat	caggaagcca	ccttcagttg	tgaatcctat	ggtgttattt	480
15	attttgttcc	tgaaatggga	tttagtgcaa	aaagtttaca	actacagtct	ttaacacatt	540
	tttttcaggg	tatgacgact	tgaatgttta	tacttttatt	ctataatttg	ccctgcactt	600
	attttacaac	ctagtaataa	tgtggataaa	tgtatctaca	tgacacatgt	caagaccaa	660
20	ataactgtga	atgacacacc	ttgctgtaaa	tgaactgtgc	taaccctgac	tgtgggcttg	720
	agaacaaaga	tgaactctag	aactctagca	gcctaactgc	tgcttctcaa	ataactgtgt	780
	gaacagtgag	atattactgt	ttgtttctaa	aaatcctact	gtgcccagtt	tccttcacta	840
25	catgccctgc	attttttatt	taaatattta	gctgtagcgc	catcagatat	ggatgccttc	900
	taacaattgc	tgtttgtaaa	ataaatcagg	atggtagaaa	gtgattatat	ggaaaattgg	960
	aacctggatg	agaccttttc	gttgaattct	gaagagtaat	gatgtgaaaa	ttgatacagg	1020
30	gcaagagatg	attcttttgt	ttttcttcta	cttcagtgtc	agaagagtaa	gagggaaaat	1080
	ggacatatgt	ttcatatcca	agggatttca	aactgtagtt	agttggtacc	tctgaaaaat	1140
	gagaatggtg	agcgcacggg	ttggttggtc	tagcatgaat	acaattctgg	aaactgttat	1200
35	gcaatttccc	ttttttaacc	cacattactt	taggggtgca	ttaagtcgcc	aaactatact	1260
	agttctttgt	attcctagac	ttgctgatat	ttacctctct	cttgtctctt	cagagtaa	1320
	ggttcccttc	tttccttcct	actttccttc	attctctctt	ccttcctcc	ttcctacttc	1380
40	ttttcttcct	tcctcttcct	ctcttaaaac	tatcttagat	gtagaatcct	ggtgtagggg	1440

45

50

55

EP 2 459 232 B1

	tttattttat ttttattttt tgacccaata aaatgttata tgaaagaatg aaaatattaa	1500
	tttaagagac tctgggagtc tgaataaagt agctttatat taactacagg ataattattag	1560
5	ccttattacc cccacaagat tttttaaaac ttgaggtagg tagctacatt aaataaattt	1620
	gctacttata taaaaatttt tatcaacact aaacttttaa agtttacaag tttttttttt	1680
	cttttttaca gtcttctata gagttagggt aaaaatgtgg ttctaaccat caacaattgc	1740
10	atggttaaatt gacctgaac taaaactgat gggttcccta tcaaaacaaa taaaaatata	1800
	cctttttcag gtttcaatct gtgcagggta tatgcatgtt aattctacca tgcttaagaa	1860
	cttccacaaa atatttcatg gagagggtctg catttagacg gaaacagaaa ttgcttttcc	1920
15	cctcactgtt cctgaatgct ctatacttgt tttaacattt ttgctatctt tttttattat	1980
	tctgatcatg atatgaccat ttaacctcag aattcataat tcctgagggg tgttaagaag	2040
	cagtcccatg ggtgaggata ttatgacttg gtgaccattc ttaggagtag aaaaccaagg	2100
20	acaattgctt ctgtattcag tatccacttc ttaatgtggc tttatatgta aaaataataa	2160
	tgcagtgggt gtttctgtca ggaaaataaa tcttacagaa caactggtag aattgaagct	2220
	gctgcttag acttgatat tttgggtagt gaagaagcaa tggcaatctt gagtctatta	2280
25	ttgtataatt tagtaaaaga aaaaaataat cgttggtagt cctactaaga gaatgcagct	2340
	tttttgagtt gtcacagagg ctgtgtgtgc cctacactga ccagggtttg taaaaccctt	2400
	tcattctggt acaagagtcg ggggtataac ttttatactt gaatctacct accaagttta	2460
30	catttctcaa ttcctttttg taagggtgcta tttctgtatt taaataactt tcttttaacg	2520
	taaagctgct ttctgcttat cttattgcac tgctagttgt atgtaggtat taattttatt	2580
	gctgcttact gcttttgttt tcttattatt tagctctgct ctttttccta atggctatat	2640
35	tatctatagc tatttacttg taactgtact acatgtaaac tgattttttg ttctgatttt	2700
	ttttctaata tttttaggaa aatattaagc tttataaaat agcaataaaa aataattcat	2760
	ttaagaagaa	2770
40	<210> 190	
	<211> 970	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 190	
50		
55		

EP 2 459 232 B1

	agccctgccc ttgcccctgt gctcaagctg tccaccatcc cgggcactcc aaggctcagt	60
	gcacccaag cctctgagtg aggacagcag gcagggactg ttctgctcct catagctccc	120
5	tgctgcctga ttatgcaaaa gtagcagtca caccctagcc actgctggga ccttggtgttc	180
	cccaagagta tctgattcct ctgctgtccc tgccaggagc tgaaggggtgg gaacaacaaa	240
	ggcaatggtg aaaagagatt aggaaccccc cagcctgttt ccattctctg cccagcagtc	300
10	tcttaccttc cctgatcttt gcaggggtgt cctgtgtaa atgtataaatt ctccaaatta	360
	tcctctaatt ataaatgtaa gcttatttcc ttagatcatt atccagagac tgccagaagg	420
	tgggtaggat gacctggggt ttcaattgac ttctgttcct tgcttttagt tttgatagaa	480
15	gggaagacct gcagtgcacg gtttcttcca ggctgaggta cctggatctt gggttcttca	540
	ctgcagggac ccagacaagt ggatctgctt gccagagtcc tttttgcccc tccctgccac	600
	ctccccgtgt ttccaagtca gctttcctgc aagaagaaat cctgggttaa aaagtctttt	660
20	gtattgggtc aggagttgaa tttgggggtgg gaggatggat gcaactgaag cagagtgtgg	720
	gtgcccagat gtgcgctatt agatgtttct ctgataatgt cccaatcat accagggaga	780
	ctggcattga cgagaactca ggtggaggct tgagaaggcc gaaagggccc ctgacctgcc	840
25	tggcttcctt agcttgcccc tcagctttgc aaagagccac cctaggcccc agctgaccgc	900
	atgggtgtga gccagcttga gaacactaac tactcaataa aagcgaaggt ggacaaaaaa	960
	aaaaaaaaa	970
30	<210> 191	
	<211> 309	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 191	
	tatcatcagt aactgcagga catgattatt gaggcttgat tggcaaatac gacttctaca	60
40	tccatattct catctttcat accatatcac actactacca ctttttgaag aatcatcaaa	120
	gagcaatgca aatgaaaaac actataattt actgtatact ctttgtttca ggatacttgc	180
	cttttcaatt gtcacttgat gatataattg caatttaaac tgtaagctg tgttcagtac	240
45	tgtttctgaa taatagaaat cacttctcta aaagcaataa atttcaagca catttttaca	300
	taaaaaaaa	309
50	<210> 192	
	<211> 976	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 192	

EP 2 459 232 B1

	aatgtgaggc gattatTTTta agtaattatc ttaccaagcc caagactggt tTTaaagtta	60
	cctgaagctc ttaactTcct cccctctgaa tttagtttg ggaaggTgtt tttagtacaa	120
5	gacatcaaag tgaagtaaag cccaagtgtt ctttagcttt ttataatact gtctaaatag	180
	tgaccatctc atgggcattg ttttcttctc tgctttgtct gtgttttgag tctgctttct	240
	tttgtcttta aaacctgatt tTTaagttct tctgaactgt agaaatagct atctgatcac	300
10	ttcagcgtaa agcagtgtgt ttattaacca tccactaagc taaaactaga gcagtttgat	360
	ttaaaagtgt cactcttctc ctttttctac tttcagtaga tatgagatag agcataatta	420
	tctgttttat cttagtttta tacataattt accatcagat agaactttat ggttctagta	480
15	cagatactct actacactca gcctcttatg tgccaagttt ttctttaagc aatgagaaat	540
	tgctcatgtt cttcatcttc tcaaattcatc agaggccaaa gaaaaacact ttggctgtgt	600
	ctataacttg acacagtcaa tagaatgaag aaaattagag tagttatgtg attatttcag	660
20	ctcttgacct gtccccctcg gctgcctctg agtctgaatc tcccaaagag agaaaccaat	720
	ttctaagagg actggattgc agaagactcg gggacaacat ttgatccaag atcttaaagt	780
25	ttatattgat aaccatgctc agcaatgagc tattagattc attttgggaa atctccataa	840
	tttcaatttg taaactttgt taagacctgt ctacattgtt atatgtgtgt gacttgagta	900
	atgttatcaa cgtttttgta aatatTTact atgtttttct attagctaaa ttccaacaat	960
30	tttgtacttt aataaa	976
	<210> 193	
	<211> 81	
	<212> DNA	
35	<213> Homo sapiens	
	<400> 193	
40	guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaa auauauuaaa caccaauuu	60
	acugugcugc uuuaguguga c	81
	<210> 194	
45	<211> 110	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 194	
50	agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag	60
	uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccua	110
55	<210> 195	
	<211> 84	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	

EP 2 459 232 B1

<400> 195

	ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu	60
5	gauuacuugu uucuggaggc agcu	84

<210> 196

<211> 72

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<400> 196

15	agauacugua aacauccuac acucucagcu guggaaagua agaaagcugg gagaaggcug	60
	uuuacucuuu cu	72

<210> 197

<211> 111

<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<400> 197

25	agaguguuca aggacagcaa gaaaaaugag ggacuuucag gggcagcugu guuuucugac	60
	ucagucauaa ugccccuaaa aauccuuuu guucuugcag ugugcaucgg g	111

<210> 198

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35 <400> 198

	agguugaggu aguagguugu auaguuuaga auuacaucaa gggagauaac uguacagccu	60
	ccuagcuuuc cu	72

<210> 199

<211> 74

<212> DNA

<213> Homo sapiens

45 <400> 199

	gggugaggua guagguugua uaguuuuggg cucugcccug cuaugggaua acuaauacaau	60
50	cuacugucuu uccu	74

<210> 200

<211> 83

<212> DNA

55 <213> Homo sapiens

<400> 200

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua cccaucuuug gagauaacua 60
uacagucuac ugucuuuccc acg 83

5 <210> 201
<211> 25
<212> RNA
<213> Homo sapiens

10 <400> 201
uaggcagugu auugcuagcg gcugu 25

<210> 202
<211> 23
15 <212> RNA
<213> homo sapiens

<400> 202
20 uugcuaguug cacuccucuc ugu 23

<210> 203
<211> 92
<212> DNA
25 <213> homo sapiens

<400> 203

gcugggaugu gucagguagg caguguauug cuagcggcug uuaaugauuu uaacaguugc 60
30 uaguugcacu ccucucuguu gcauucagaa gc 92

<210> 204
<211> 20
<212> DNA
35 <213> Homo sapiens

<400> 204
ccagctaaca atacactgcc 20

40 <210> 205
<211> 21
<212> DNA
<213> homo sapiens

45 <400> 205
agctatgcca gcatcttgcc t 21

<210> 206
<211> 22
50 <212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 206
55 gtgtaacacg tctatacgcc ca 22

<210> 207
<211> 22
<212> DNA

5 <213> Homo sapiens
 <400> 207
 accagcuaac aaucacugc ca 22
 10 <210> 208
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 208
 causcgucga ucguagcgca 20
 <210> 209
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> xenopus laevis
 20 <400> 209
 accagctaac attacactgc ct 22
 <210> 210
 <211> 25
 <212> DNA
 25 <213> xenopus laevis
 <400> 210
 acagccagct agcaagtgca ctgcc 25
 30 <210> 211
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> xenopus laevis
 35 <400> 211
 acagccagct agcaagtgca ctgcc 25
 <210> 212
 <211> 22
 40 <212> DNA
 <213> xenopus laevis
 <400> 212
 45 tgcacgttcc aatacagacc gt 22

Revendications

1. miARN sélectionné dans le groupe constitué par hsa-miR-92b (SEQ ID N°49), hsa-miR-1975 (SEQ ID N°15), hsa-miR-99a (SEQ ID N°52), hsa-miR-191 (SEQ ID N°13), hsa-miR-378 (SEQ ID N°43), hsa-miR-125a-5p (SEQ ID N°3), hsa-miR-203 (SEQ ID N°19), et leur précurseurs de séquence SEQ ID N°107, 117, 119, 123, 147, 153 et 156 et/ou au moins un brin complémentaire des miARN éventuellement modifié chimiquement choisis parmi hsa-miR-205, hsa-miR-17, hsa-miR-29a, hsa-miR-193b, hsa-miR-210 hsa-miR-130a : hsa-miR-205* (SEQ ID N°72), hsa-miR-31 et hsa-miR-31* (SEQ ID N°37 et 89), hsa-miR-17* (SEQ ID N°63), hsa-miR-29a* (SEQ ID N°83), hsa-miR-193b* (SEQ ID N°66), hsa-miR-210* (SEQ ID N°74), hsa-miR-130a* (SEQ ID N°56) et leur précurseurs de séquence SEQ ID N°108, 115, 118, 124 à 126, 135 et 141 pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement de désordres liés à un dysfonctionnement des cils de tissu épithélial cilié.

2. miARN selon la revendication 1 pour son utilisation selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** les désordres liés à un dysfonctionnement des cils de tissu épithélial cilié sont des ciliopathies primaires choisies parmi la dyskinesie ciliaire primaire ou syndrome de Kartagener ; *situs inversus*; l'infertilité masculine et féminine ; le syndrome d'Alstrom ; le syndrome de Bardet-Biedl ; le syndrome de Meckel-Gruber ; la polykystique des reins ; la dégénération rétinienne ; le syndrome de Senior-loken ou des ciliopathologies secondaires choisies parmi la mucoviscidose ; les broncho-pneumopathies obstructives chroniques (BCPO) ; l'asthme ; la bronchiolite et les infections respiratoires d'origine virale.
3. miARN **caractérisé en ce qu'il** comporte, du 2^{ème} au 8^{ème} nucléotide ou du 3^{ème} au 9^{ème} nucléotide, une séquence de reconnaissance sélectionnée dans le groupe constitué par GGCAGUG (SEQ ID N°175), AAUCACU (SEQ ID N°176) et AUCACUA (SEQ ID N°177) pour son utilisation pour la prévention et/ou le traitement des ciliopathies primaires choisies parmi la dyskinesie ciliaire primaire ou syndrome de Kartagener ; *situs inversus* ; l'infertilité masculine et féminine ; le syndrome d'Alstrom ; le syndrome de Bardet-Biedl ; le syndrome de Meckel-Gruber ; la dégénération rétinienne ; le syndrome de Senior-loken ou des ciliopathologies secondaires choisies parmi la mucoviscidose ; les broncho-pneumopathies obstructives chroniques (BCPO) ; l'asthme ; la bronchiolite et les infections respiratoires d'origine virale.
4. miARN selon la revendication 3 pour son utilisation selon la revendication 3, **caractérisé en ce que** ledit miARN est sélectionné dans le groupe constitué par hsa-miR-34a (SEQ ID N°38), hsa-miR-34b (SEQ ID N°39), hsa-miR-34c-5p (SEQ ID N°40), hsa-miR-449a (SEQ ID N°46), hsa-miR-449b (SEQ ID N°47) et hsa-miR-449c (SEQ ID N°201).
5. miARN selon la revendication 1 pour son utilisation selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** les désordres liés à un dysfonctionnement des cils de tissu épithélial cilié sont des pathologies impliquant un désordre de la régénération et/ou de la différenciation de l'épithélium respiratoire.
6. miARN selon la revendication 5 pour son utilisation selon la revendication 5, **caractérisé en ce que** les pathologies impliquant un désordre de la régénération et/ou de la différenciation de l'épithélium respiratoire sont choisies dans le groupe constitué par des maladies respiratoires chroniques et/ou héréditaires choisies parmi les broncho-pneumopathies obstructives chroniques (BCPO), la mucoviscidose, l'asthme, la dyskinesie ciliaire primaire, les inflammations et infections chroniques des voies respiratoires et les insuffisances respiratoires.

Patentansprüche

1. Micro-RNA, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet ist von hsa-miR-92b (SEQ ID NR. 49), hsa-miR-1975 (SEQ ID NR. 15), hsa-miR-99a (SEQ ID NR. 52), hsa-miR-191 (SEQ ID NR. 13), hsa-miR-378 (SEQ ID NR. 43), hsa-miR-125a-5p (SEQ ID NR. 3), hsa-miR-203 (SEQ ID NR. 19) und ihren Vorläufern mit der Sequenz SEQ ID NR. 107, 117, 119, 123, 147, 153 und 156 und/oder mindestens einem komplementären Strang der eventuell chemisch modifizierten Micro-RNA, ausgewählt aus hsa-miR-205, hsa-miR-17, hsa-miR-29a, hsa-miR-193b, hsa-miR-210 hsa-miR-130a: hsa-miR-205* (SEQ ID NR. 72), hsa-miR-31 und hsa-miR-31* (SEQ ID NR. 37 und 89), hsa-miR-17* (SEQ ID NR. 63), hsa-miR-29a* (SEQ ID NR. 83), hsa-miR-193b* (SEQ ID NR. 66), hsa-miR-210* (SEQ ID NR. 74), hsa-miR-130a* (SEQ ID NR. 56) und ihren Vorläufern mit der Sequenz SEQ ID NR. 108, 115, 118, 124 bis 126, 135 und 141 für ihre Verwendung zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Störungen, die mit einer Fehlfunktion der Zilien des zilierten Epithelgewebes verbunden sind.
2. Micro-RNA nach Anspruch 1 für ihre Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Störungen, die mit einer Fehlfunktion der Zilien des zilierten Epithelgewebes verbunden sind, primäre Ziliopathien, die ausgewählt sind aus der primären Ziliendyskinesie oder dem Kartagener-Syndrom; *situs inversus*; der Unfruchtbarkeit beim Mann und bei der Frau; dem Alstrom-Syndrom; dem Bardet-Biedl-Syndrom; dem Meckel-Gruber-Syndrom; der multizystischen Niere; der Netzhautdegeneration; dem Senior-loken-Syndrom oder sekundäre Ziliopathien, ausgewählt aus der Mukoviszidose; den chronischen obstruktiven Broncho-Pneumopathien (COPD); dem Asthma; der Bronchiolitis und den viralen Atemwegserkrankungen, sind.
3. Micro-RNA, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie vom 2. bis 8. Nukleotid oder vom 3. bis 9. Nukleotid eine Erkennungssequenz aufweist, ausgewählt aus der Gruppe, die gebildet ist von GGCAGUGA (SEQ ID NR. 175), AAUCACU (SEQ ID NR. 176) und AUCACUA (SEQ ID NR. 177), für ihre Verwendung zur Vorbeugung und/oder Behandlung von primären Ziliopathien, ausgewählt aus der primären Ziliendyskinesie oder dem Kartagener-Syndrom; situs

invertus; der Unfruchtbarkeit beim Mann und bei der Frau; dem Alstrom-Syndrom; dem Bardet-Biedl-Syndrom; dem Meckel-Gruber-Syndrom; der Netzhautdegeneration; dem Senior-Loken-Syndrom oder von sekundären Ziliopathien, ausgewählt aus der Mukoviszidose; den chronischen obstruktiven Broncho-Pneumopathien (COPD); dem Asthma; der Bronchiolitis und den viralen Atemwegserkrankungen.

4. Micro-RNA nach Anspruch 3 für ihre Verwendung nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Micro-RNA aus der Gruppe ausgewählt ist, die von hsa-miR-34a (SEQ ID NR. 38), hsa-miR-34b (SEQ ID NR. 39), hsa-miR-34c-5p (SEQ ID NR. 40), hsa-miR-449a (SEQ ID NR. 46), hsa-miR-449b (SEQ ID NR. 47) und hsa-miR-449c (SEQ ID NR. 201) gebildet ist.
5. Micro-RNA nach Anspruch 1 für ihre Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die mit einer Fehlfunktion der Zilien des zilierten Epithelgewebes verbundenen Störungen Erkrankungen sind, die eine Fehlfunktion der Regeneration und/oder der Differenzierung des respiratorischen Epitheliums implizieren.
6. Micro-RNA nach Anspruch 5 für ihre Verwendung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Erkrankungen, die eine Störung der Regeneration und/oder der Differenzierung des respiratorischen Epitheliums implizieren, aus der Gruppe ausgewählt sind, die von den chronischen und/oder erblichen Atemwegserkrankungen gebildet ist, die aus den chronischen obstruktiven Broncho-Pneumopathien (COPD), der Mukoviszidose, dem Asthma, der primären Ziliendyskinesie, den chronischen Entzündungen und Infektionen der Atemwege und der respiratorischen Insuffizienz ausgewählt sind.

Claims

1. A miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-92b (SEQ ID NO.49), hsa-miR-1975 (SEQ ID NO.15), hsa-miR-99a (SEQ ID NO.52), hsa-miR-191 (SEQ ID NO.13), hsa-miR-378 (SEQ ID NO.43), hsa-miR-125a-5p (SEQ ID NO.3), hsa-miR-203 (SEQ ID NO.19), and their sequence precursors SEQ ID NOS.107,117,119,123,147,153 and 156 and/or at least one complementary strand of miRNAs, optionally chemically modified selected from among hsa-miR-205, hsa-miR-17, hsa-miR-29a, hsa-miR-193b, hsa-miR-210, hsa-miR-130a: hsa-miR-205* (SEQ ID NO.72), hsa-miR-31 and hsa-miR-31* (SEQ ID NOS.37 and 89), hsa-miR-17* (SEQ ID NO.63), hsa-miR-29a* (SEQ ID NO.83), hsa-miR-193b (SEQ ID NO.66), hsa-miR-210* (SEQ ID NO.74), hsa-miR-130a* (SEQ ID NO.56), and their sequence precursors SEQ ID NOS.108, 115, 118, 124 to 126, 135 and 141 for its use for preventing and/or treating disorders related to dysfunction of the lashes of ciliated epithelial tissue.
2. The miRNA according to claim 1, for its use according to claim 1, **characterized in that** the disorders related to dysfunction of the lashes of the ciliated epithelial tissue are primary ciliopathies selected from among primary ciliary dyskinesia or Kartagener's syndrome; *situs invertus*; male and female infertility, Alstrom's syndrome; Bardet-Biedl syndrome; Meckel-Gruber syndrome; polycystic kidney disease; retinal degeneration; Senior-Loken syndrome or secondary ciliopathies selected from among cystic fibrosis; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); asthma; bronchiolitis and respiratory infections of viral origin.
3. An miRNA, **characterized in that** it includes from the 2nd to the 8th nucléotide or from the 3rd to the 9th nucleotide, a recognition sequence), selected from the group formed with GGCAGUG (SEQ ID NO.175), AAUCACU (SEQ ID NO.176) and AUCACUA (SEQ ID NO.177) for its use for preventing and/or treating primary ciliopathies selected from primary ciliary dyskinesia or Kartagener's syndrome; *situs invertus*; male and female infertility, Alstrom's syndrome; Bardet-Biedl syndrome; Meckel-Gruber syndrome; retinal degeneration; Senior-Loken syndrome or secondary ciliopathies selected from among cystic fibrosis; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); asthma; bronchiolitis and respiratory infections of viral origin.
4. The miRNA according to claim 3 for its use according to claim 3, **characterized in that** said miRNA is selected from the group formed with hsa-miR-34a (SEQ ID NO.38), hsa-miR-34b (SEQ ID NO.39), hsa-miR-34c-5p (SEQ ID NO.40), hsa-miR-449a (SEQ ID NO.46), hsa-miR-449b (SEQ ID NO.47) and hsa-miR-449c (SEQ ID NO.201).
5. The miRNA according to claim 1, for its use according to claim 1, **characterized in that** the disorders related to dysfunction of the lashes of the ciliated epithelial tissue are pathologies involving a disorder of the regeneration and/or the differentiation of the respiratory epithelium.
6. The miRNA according to claim 5, for its use according to claim 5, **characterized in that** the pathologies involving

EP 2 459 232 B1

a disorder of the regeneration and/or the differentiation of the respiratory epithelium are selected from among the group formed with chronic and/or hereditary respiratory diseases selected from among chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), cystic fibrosis, asthma, primary ciliar dyskinesia, chronic inflammations and infections of respiratory airways and respiratory disorders.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

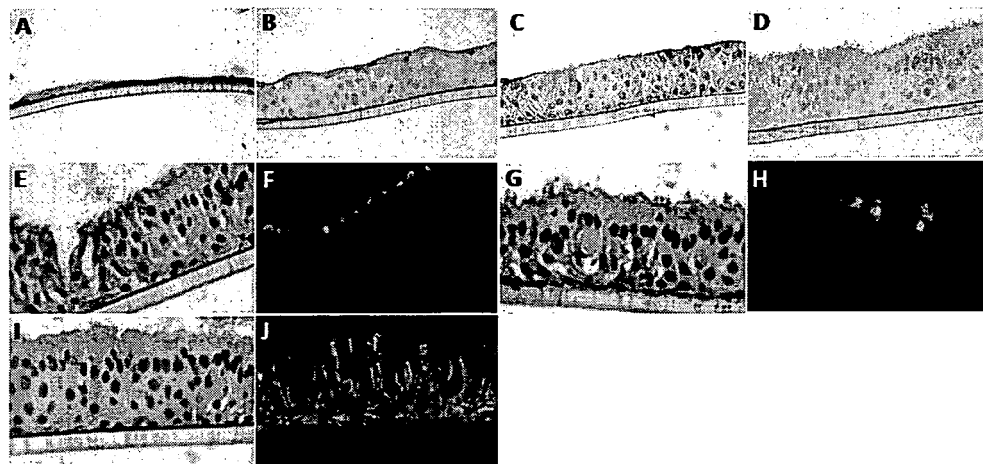


Figure 1

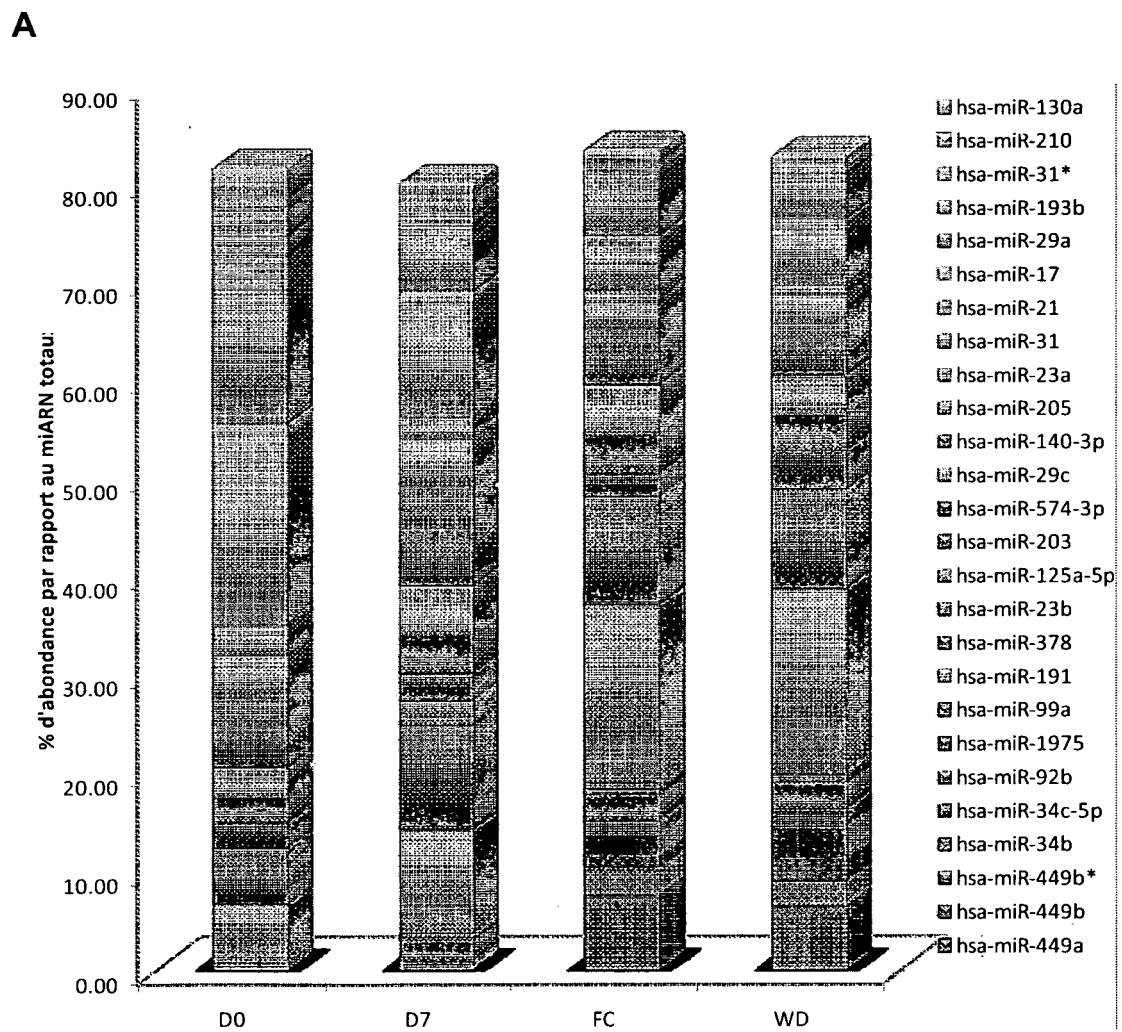


Figure 2A

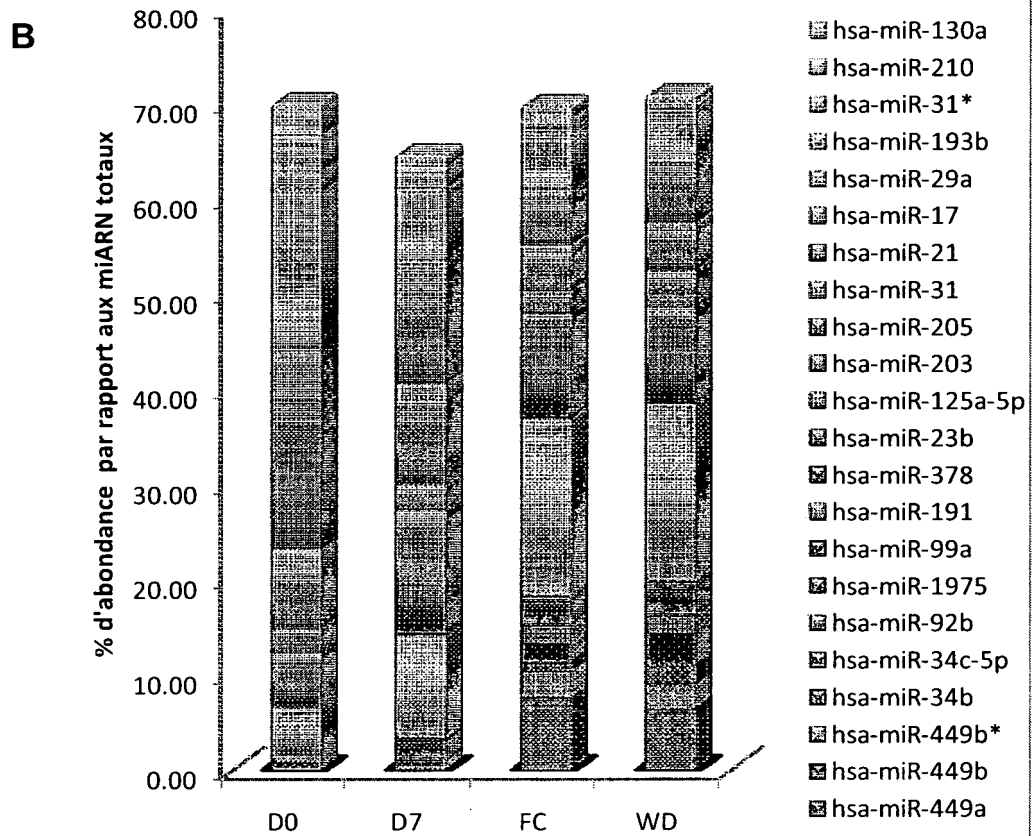


Figure 2B

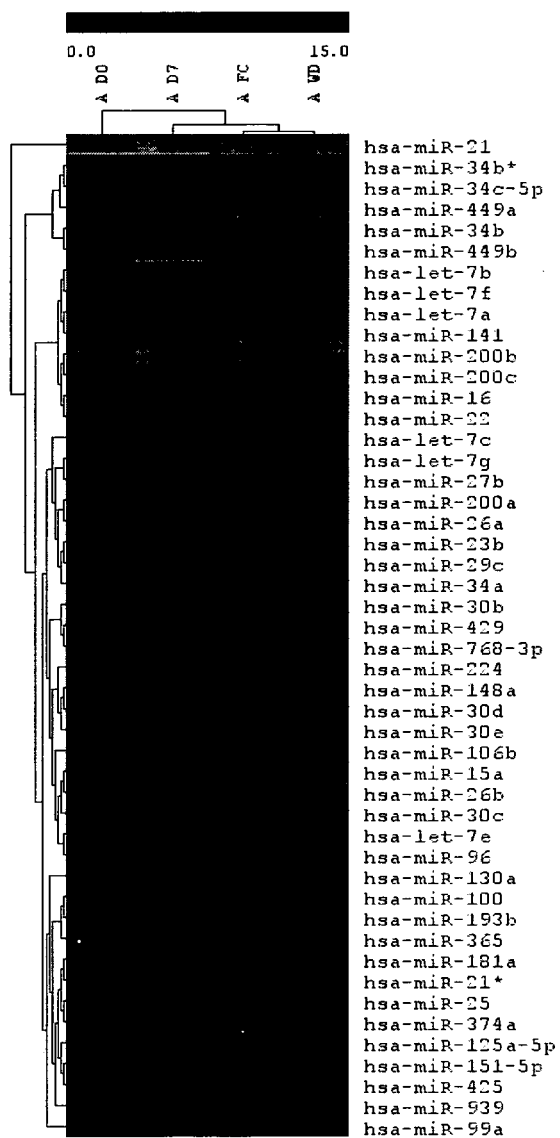


Figure 3

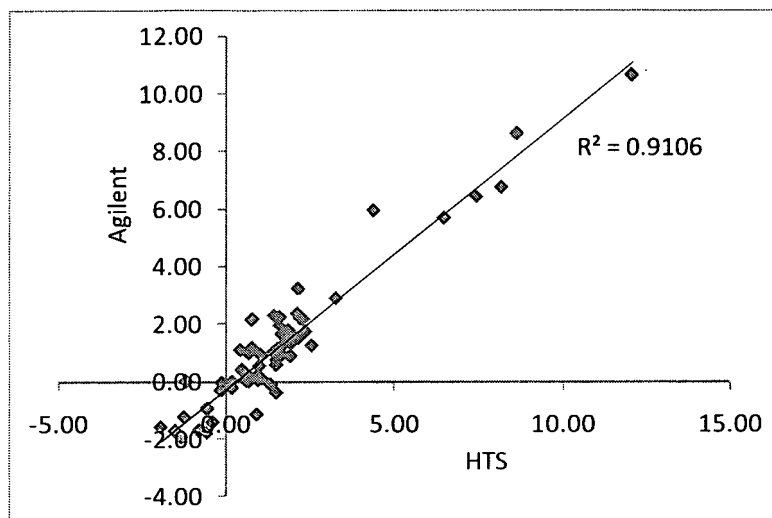


Figure 4

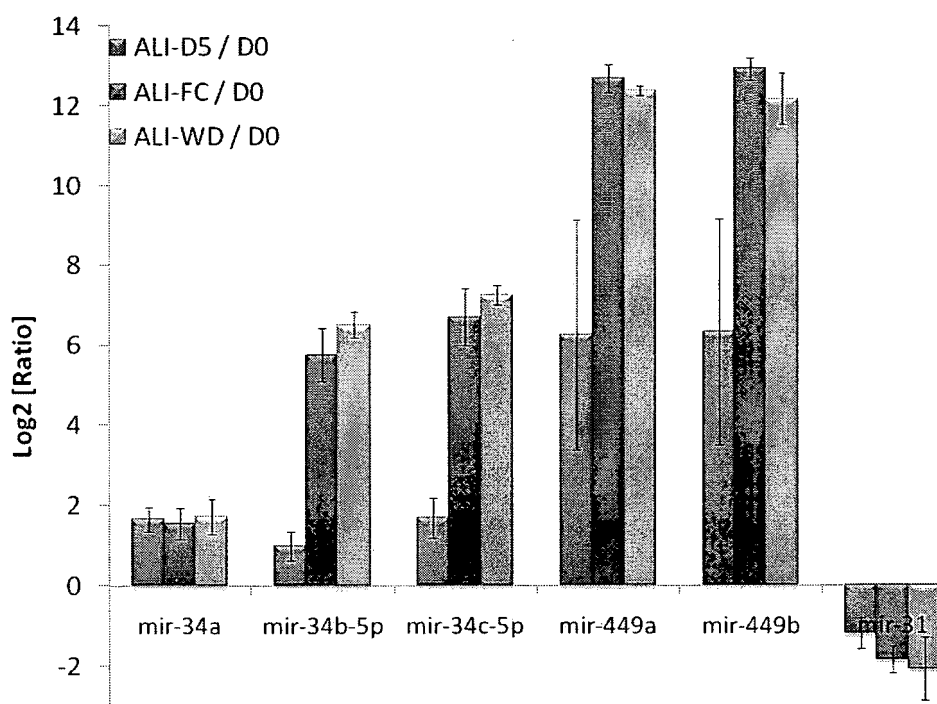


Figure 5

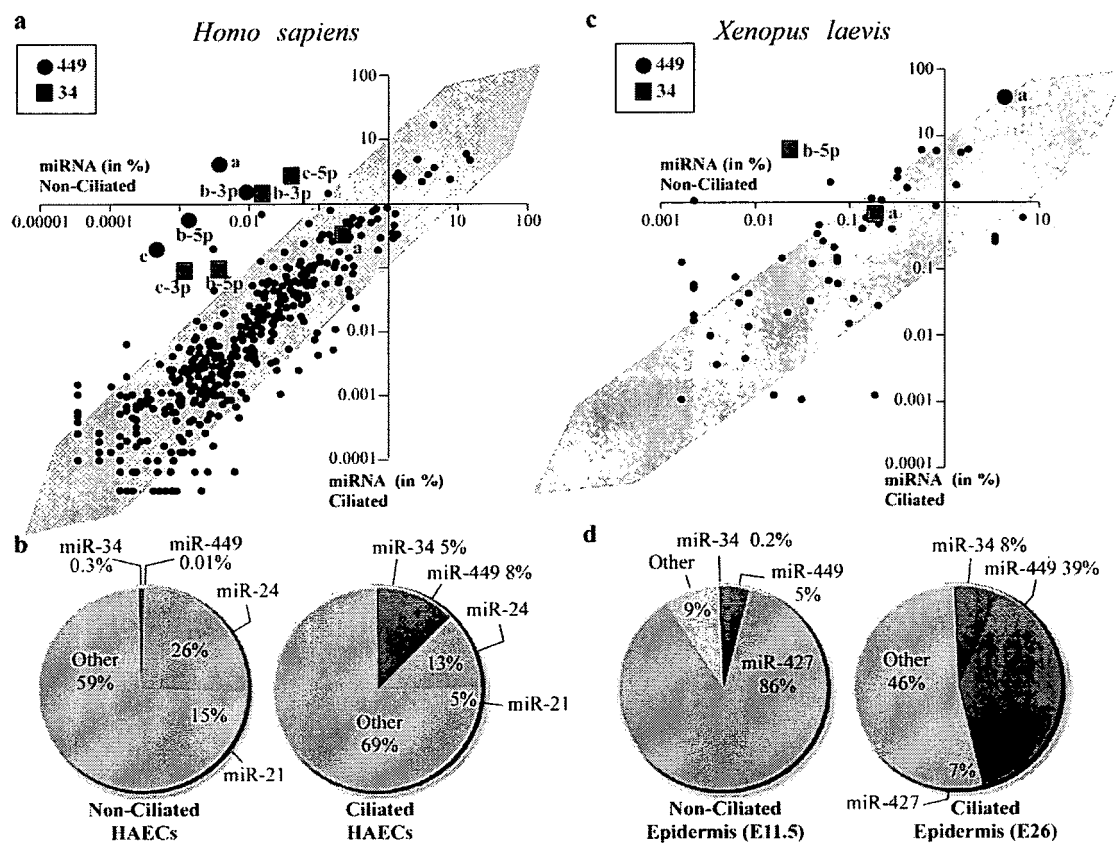


Figure 6

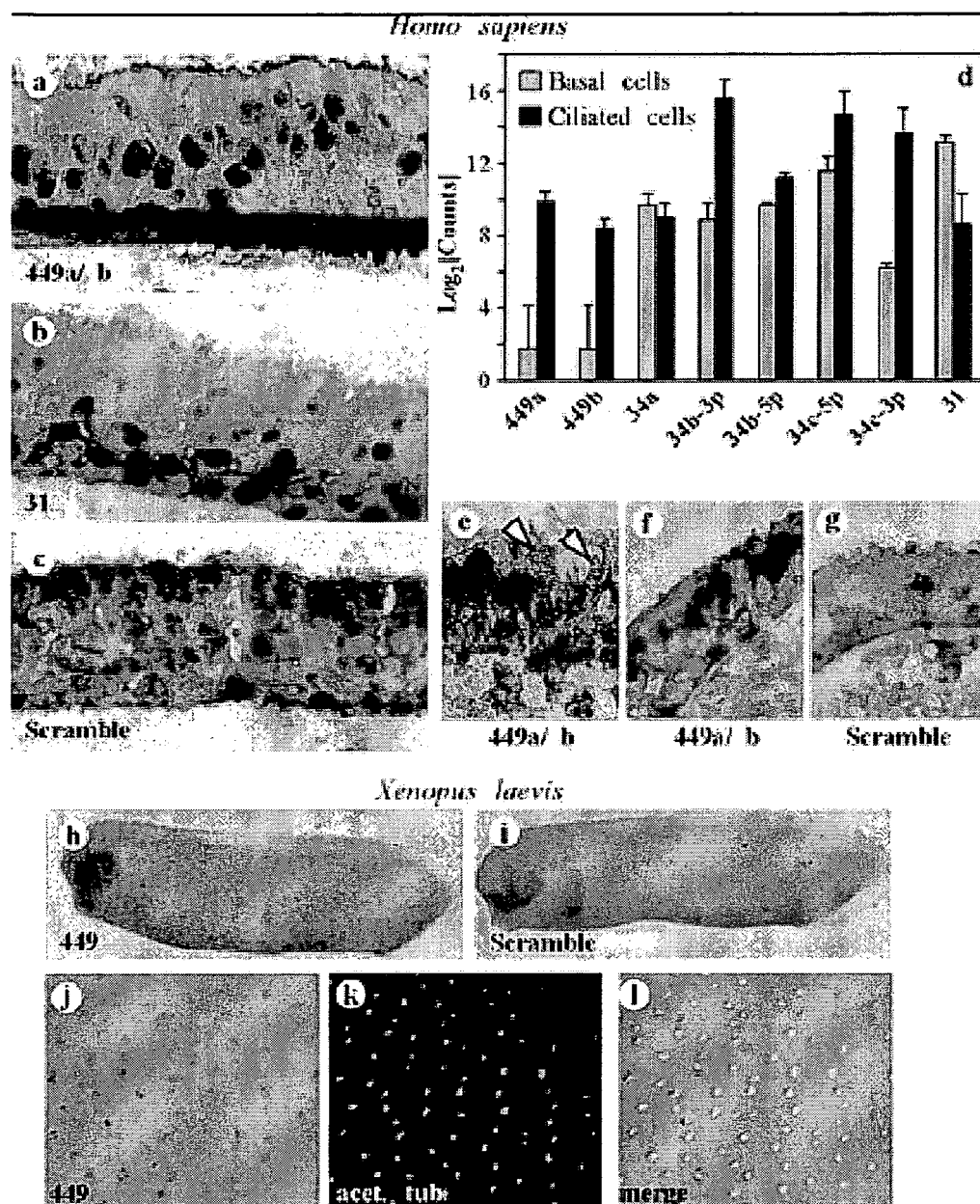


Figure 7

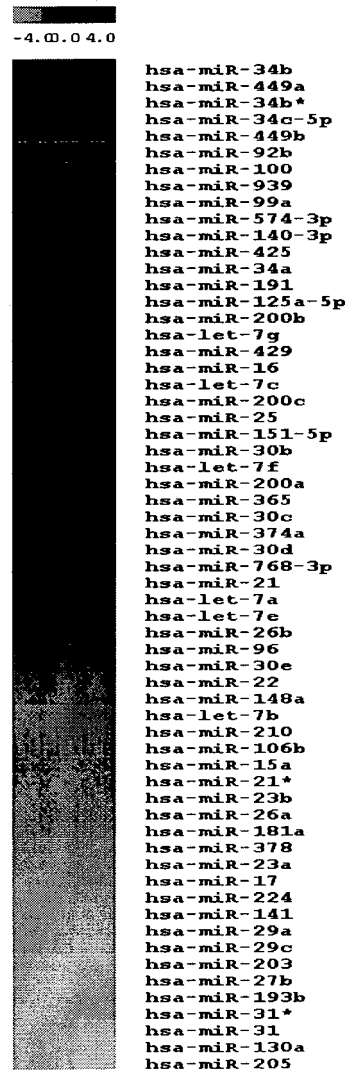


Figure 8

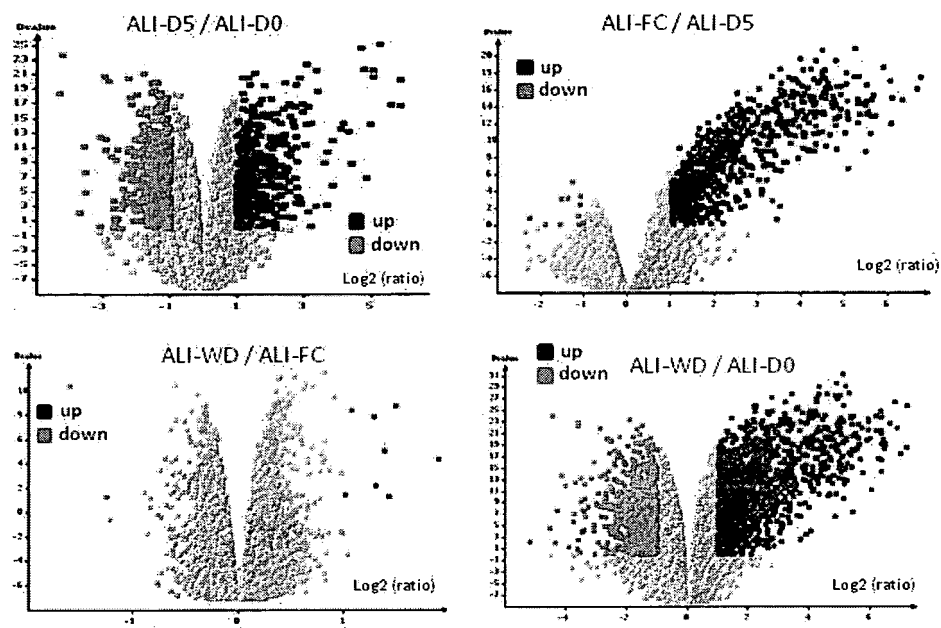


Figure 9

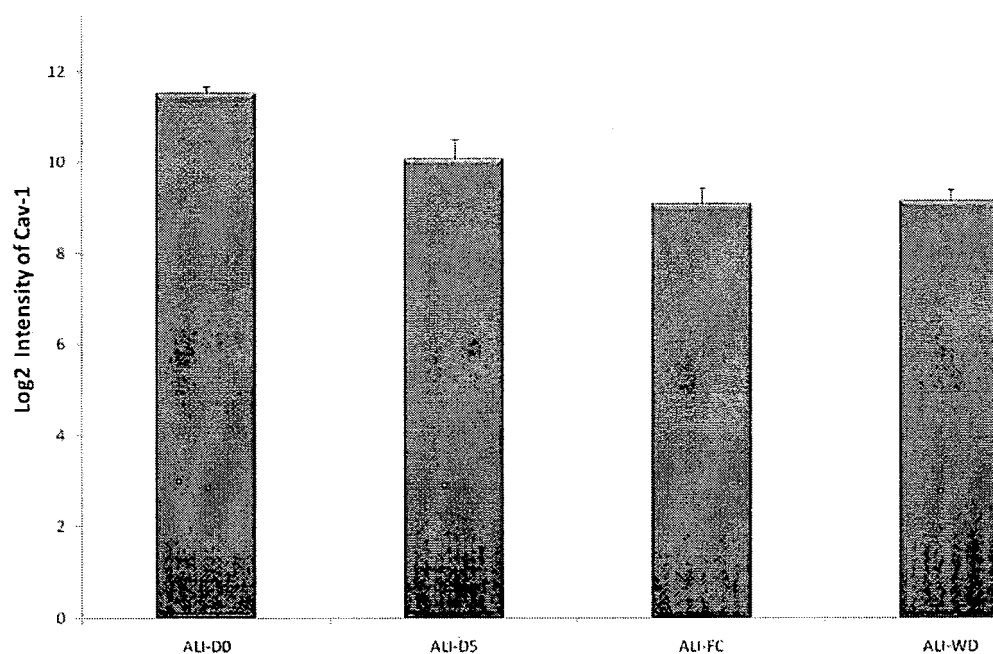


Figure 10

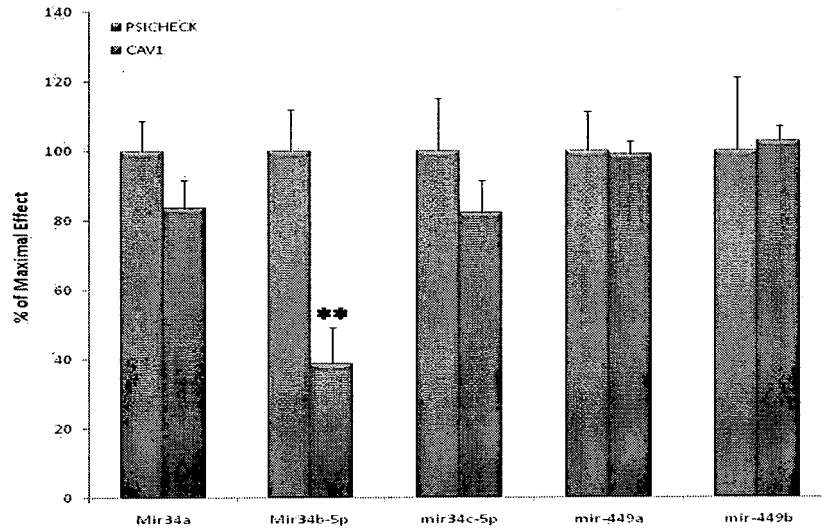


Figure 11

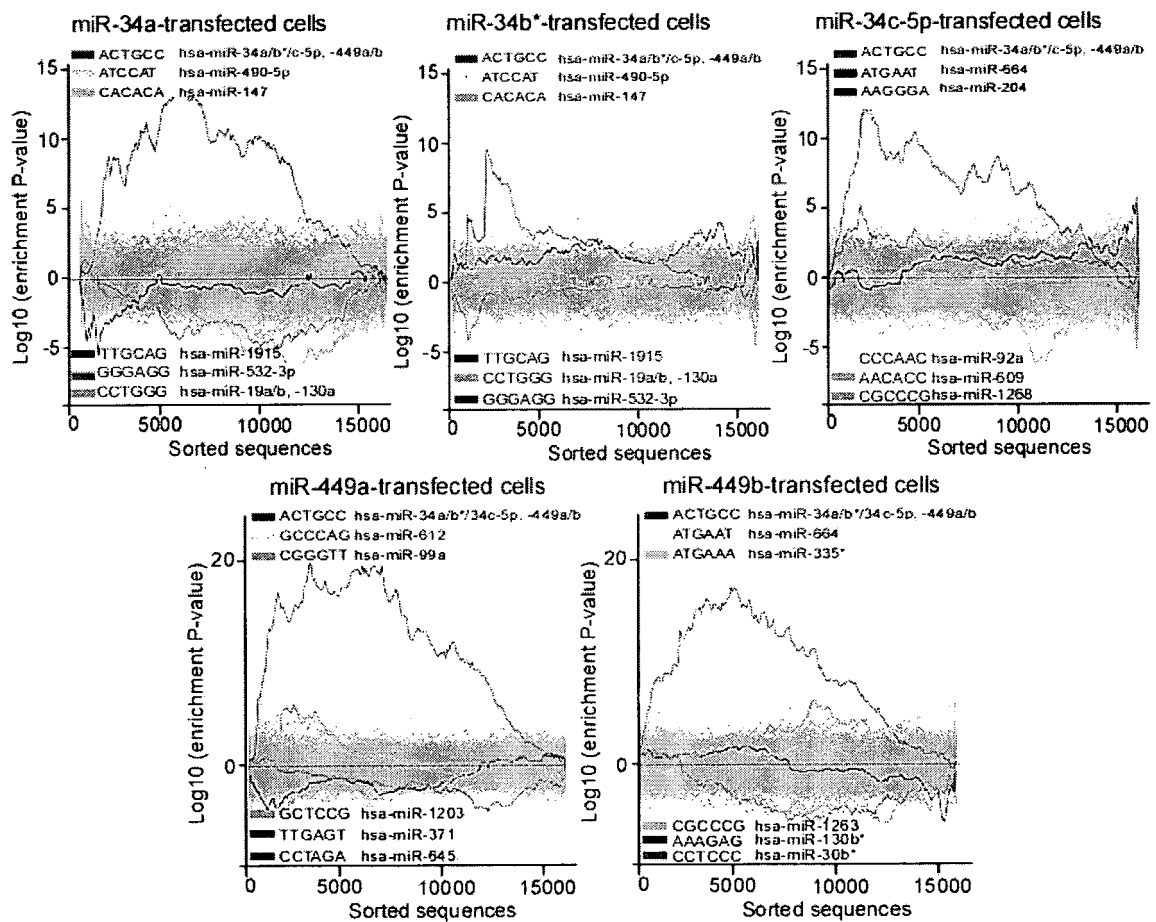


Figure 12

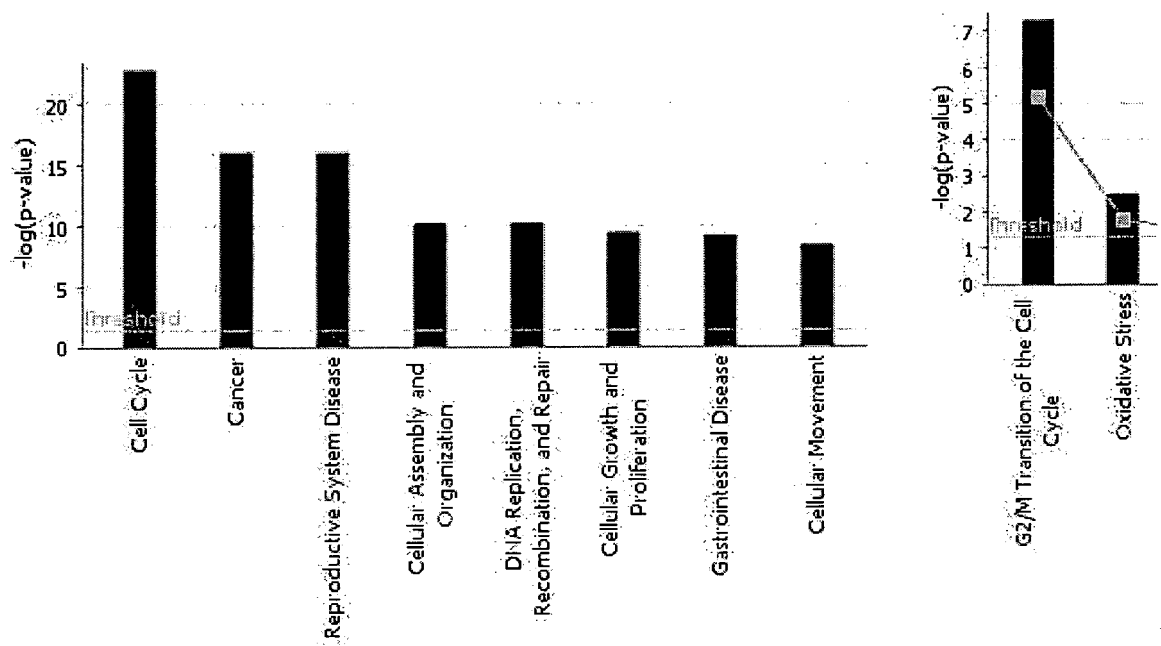


Figure 13

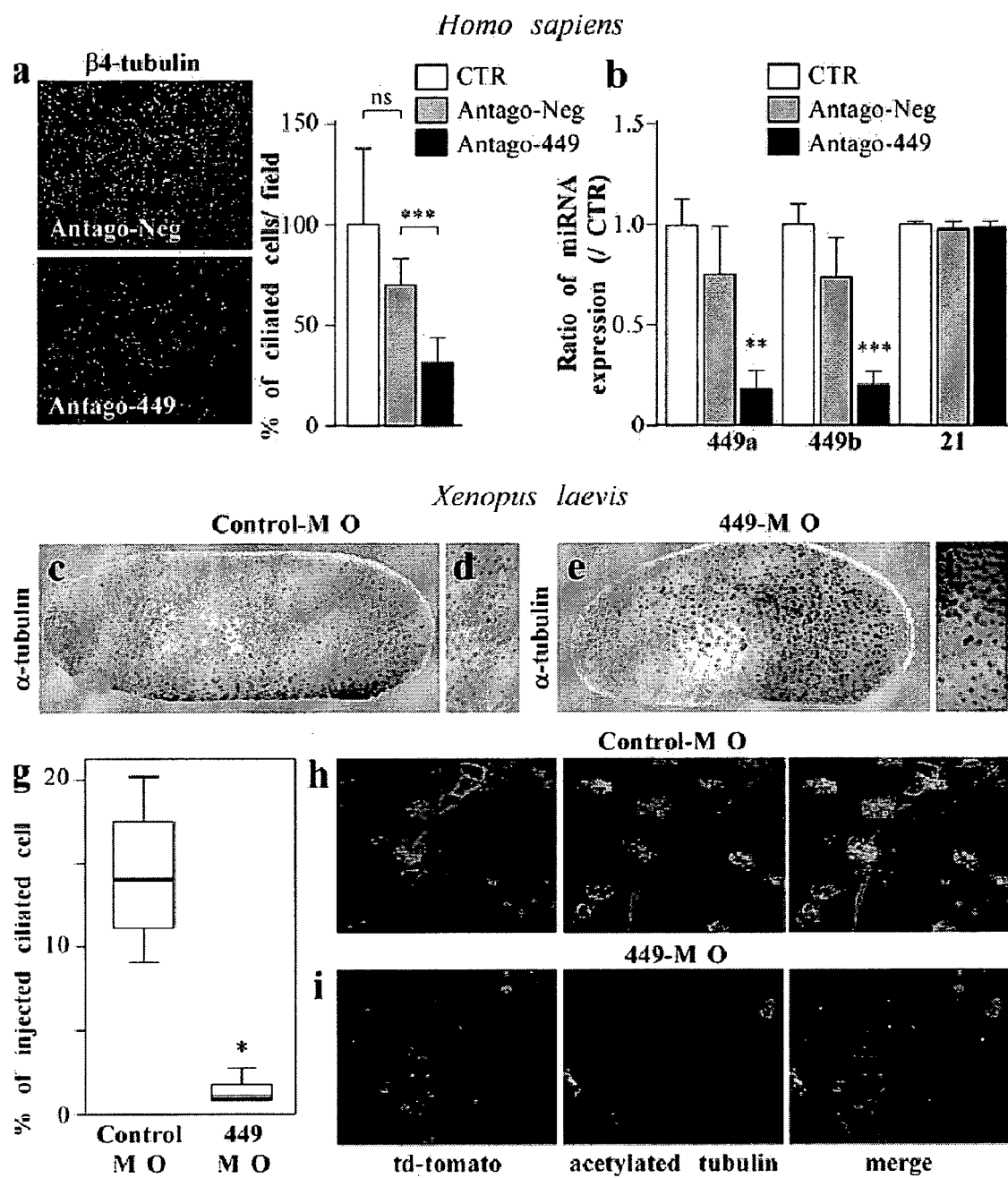


Figure 14

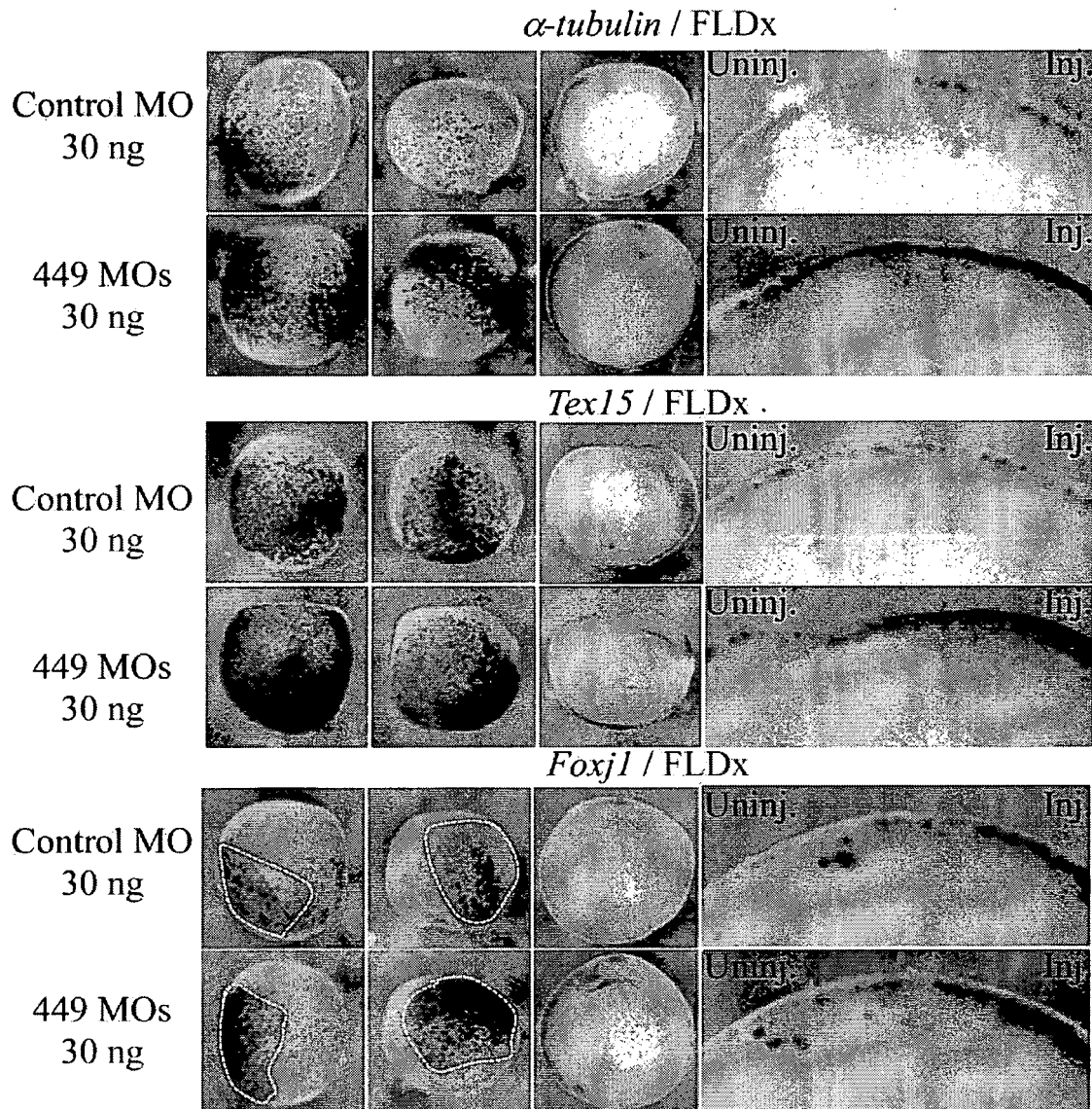


Figure 15

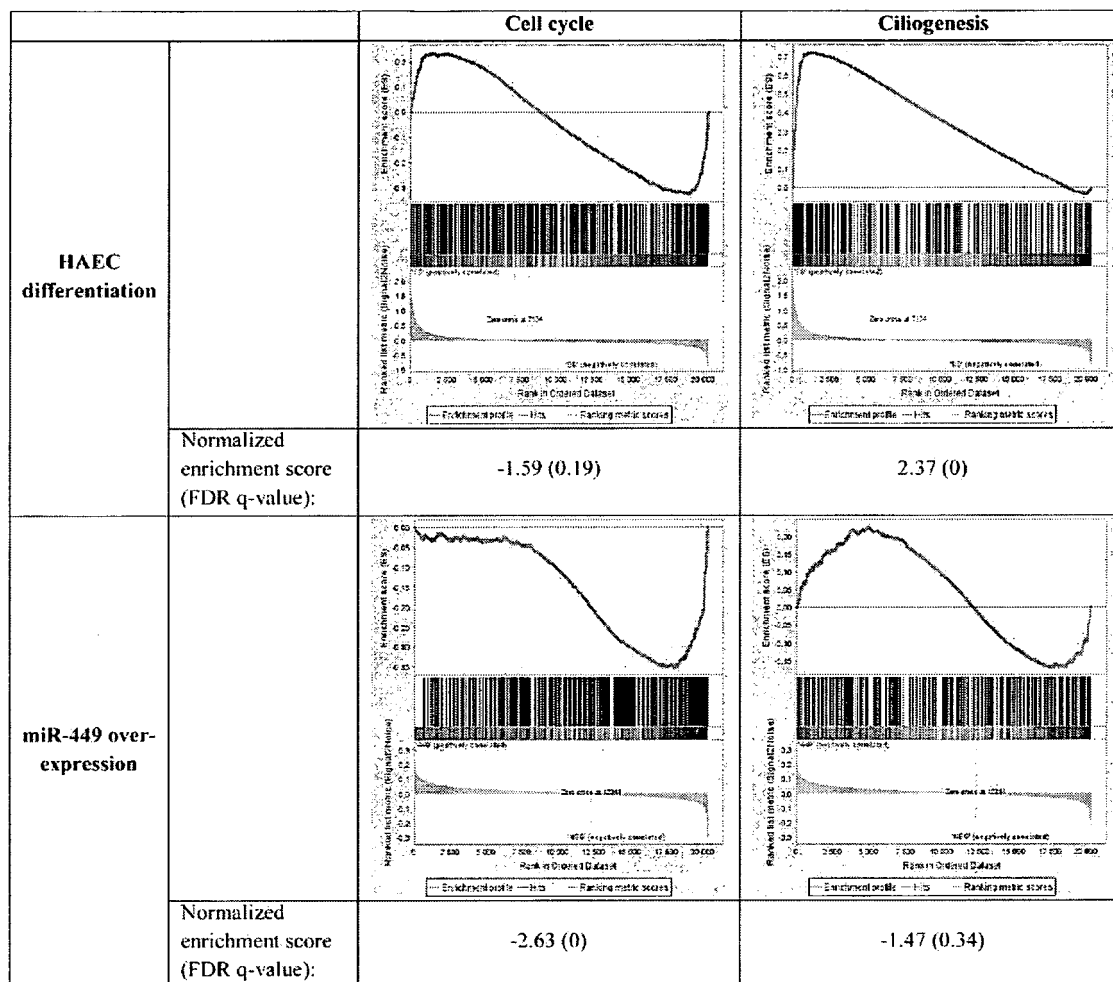


Figure 16

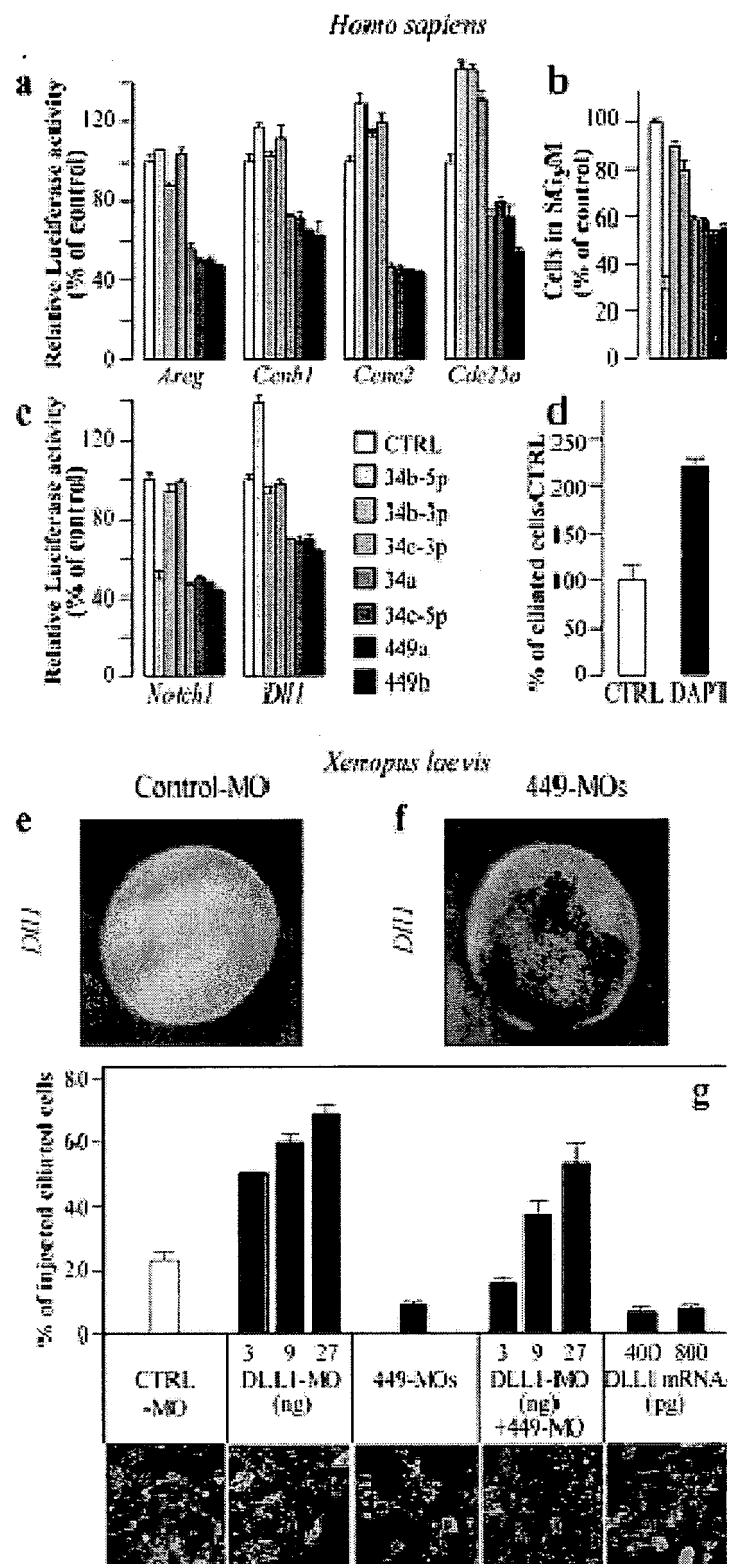


Figure 17

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- WO 20071021896 A [0034]

Littérature non-brevet citée dans la description

- **PUCHELLE et al.** *Proc Am Thorac Soc*, 2006, vol. 3, 726-733 [0005]
- **HAJJ, R. et al.** *J Pathol*, 2007, vol. 211, 340-350 [0007]
- **YU, X. et al.** *Nat Genet*, 2008, vol. 40, 1445-1453 [0009]
- **GOMPERTS, B.N. et al.** *J Cell Sci*, 2004, vol. 117, 1329-1337 [0009]
- **MARSHALL, W.F.** *J Cell Biol*, 2008, vol. 180, 17-21 [0010]
- **LU, Y. et al.** *Dev Biol*, 2007, vol. 310, 442-453 [0012]
- **BEREZIKOV, E. et al.** *Cell*, 2005, vol. 120, 21-24 [0014]
- **XIE, X. et al.** *Nature*, 2005, vol. 434, 338-345 [0014]
- **LENA, A.M. et al.** *Cell Death Differ*, 2008, vol. 15, 1187-1195 [0016]
- **YI, R. et al.** *Nature*, 2008, vol. 452, 225-229 [0016]
- **LU, Y. et al.** (2007) *Dev Biol*, 2007, vol. 310, 442-453 [0016]
- **HARRIS, K.S. et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, vol. 103, 2208-2213 [0016]
- **LU, Y. et al.** *Proc Am Thorac Soc*, 2008, vol. 5, 300-304 [0016]
- **TRIBOULET, R. et al.** *Science*, 2007, vol. 315, 1579-1582 [0017]
- **CALIN, G.A. ; CROCE, C.M.** *Nat Rev Cancer*, 2006, vol. 6, 857-866 [0017]
- **GRASSMANN, R. ; JEANG, K.T.** *Biochim Biophys Acta*, 2008, vol. 1779, 706-711 [0017]
- **LATRONICO, M.V.** *Physiol Genomics*, 2008, vol. 34, 239-242 [0017]
- **POY, M.N. et al.** *Nature*, 2004, vol. 432, 226-230 [0017]
- **T. M. RANA.** *Nature Reviews*, 2007, vol. 8, 23-36 [0034]
- **SCHAYCK et al.** IPAG DIAGNOSIS & MANAGEMENT HANDBOOK. *Chronic Airways Diseases. A Guide for Primary Care Physicians*, 2005, vol. 1-34 [0039]
- **DONGEN S et al.** *Nat Methods*, Décembre 2008, vol. 5 (12), 1023-5 [0052]
- **HAJJ, R. et al.** *Stem Cells*, 2007, vol. 25, 139-148 [0059]
- **HAYES et al.** *Dev Biol*, 2007, vol. 312 (1), 115 [0066] [0084]
- Introductory statistics with R. **PETER DALGAARD.** statistics and computing. Springer, 2002 [0073]
- Statistics for biology and health. **R. GENTLEMAN ; V.J. CAREY ; W. HUBER ; R.A. IRIZARRY ; S. DUDOIT.** Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor. Springer, 2005 [0073]
- **MARCHAL, L. et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, vol. 106 (41), 17437 [0084]
- **KLOOSTERMAN et al.** *Nat Methods*, 2006, vol. 3 (1), 27 [0084]
- **DEBLANDRE et al.** *Development*, 1999, vol. 126 (21), 4715 [0084] [0164]
- **POHL et al.** *Dev Genes Evol*, 2004, vol. 214 (4), 200 [0084]
- **KRASTEVA, G. et al.** *Respir Res*, 2006, vol. 7, 108 [0120]
- **YANG, G. et al.** *Exp Mol Pathol*, 2008, vol. 84, 131-140 [0120]
- **LE SAUX, C.J. et al.** *J Biol Chem*, 2008, vol. 283, 5760-5768 [0121]
- **NORKIN, L.C. et al.** *Exp Cell Res*, 2001, vol. 266, 229-238 [0122]
- **WALTERS, R.W. et al.** *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, 10219-10226 [0122]
- **PICKLES, R.J. et al.** *Hum Gene Ther*, 1996, vol. 7, 921-931 [0122]
- **MORICHKA et al.** *Dev Growth Differ*, 2010, vol. 52 (2), 235 [0145]
- **POTTIER et al.** *PLoS One*, 2009, vol. 4 (8), e6718 [0155]
- **EDGAR et al.** *Nucleic Acids Res*, 2002, vol. 30 (1), 207 [0156]
- **FENG, M. et al.** *Cell Cycle*, 2010, vol. 9 (2), 213 [0158]
- **LIZE et al.** *Cell Death Differ*, 2009 [0158]
- **NOONAN et al.** *Oncogene*, 2009, vol. 28 (14), 1714 [0158]
- **YANG, X. et al.** *Genes Dev*, 2009, vol. 23 (20), 2388 [0158]
- **TSAO et al.** *Development*, 2009, vol. 136 (13), 2297 [0159]